

# PCB i miljøet som mulig årsak til utvikling av ADHD

*Målinger av reseptorbinding og aminosyrenivå i hjernen*

**Kine-Susann Noren Dervola**



Masteroppgave i toksikologi, Biologisk institutt

**UNIVERSITETET I OSLO**

Juni 2009

## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for medisinske basalfag, Avdeling for biokjemi. Arbeidet ble utført høst 2007 til vår 2009 som en del av mastergrad i toksikologi ved Universitetet i Oslo. Jeg vil gi en stor takk til min hovedveileder Professor emeritus Frode Fonnum, som har vært uunnværlig for arbeidet og har stilt opp med gode ideer i tillegg til kunnskap og inspirasjon. I tillegg vil jeg takke min internveileder Professor Steinar Øvrebø for gjennomlesing av oppgaven. Professor Ivar Walaas vil jeg takke for å ha stilt opp med midler og lokaler til arbeidet i tillegg til interessante samtaler og kunnskap innen fagfeltet.

Post doc. Inger Lise Bogen fortjener en stor takk for all hjelp under skriveprosessen, opplæring og med statistikk. Stipendiat Mattis Brønne Wigestrands fortjener også en stor takk for hjelp med laboratoriearbeidet og teoretisk kunnskap. Jeg vil også takke Bjørge Roberg som har vært essensiell under opplæring av HPLC-analyse.

Jeg vil si takk til masterstudent Ole Rostad, avdelingsingeniør Ann-Kristin Molværsmyr og stipendiat Angel-Moldes Anaya for hyggelige samtaler og selskap på labben.

I tillegg vil jeg takke Terje Sagvolden, Grete Wøien og Espen Borgå Johansen ved Fysiologisk avdeling for innblikk i hvordan atferdtesting av rotter foregikk, noe som var utrolig spennende. Jeg vil også takke dem for å ha gitt oss fine grafer.

Jeg vil til slutt takke min familie og venner for tålmodighet og all støtte de har gitt. I tillegg fortjener min forlovede Uy en stor takk for motivering og støtte når jeg har hatt det travelt på labben. Tusen takk!

Universitetet i Oslo, 1. Juni 2009

Kine-Susann Noren Dervola

---

# Innhold

<b>FORORD .....</b>	<b>2</b>
<b>INNHold .....</b>	<b>3</b>
<b>SAMMENDRAG .....</b>	<b>7</b>
<b>FORKORTELSER .....</b>	<b>9</b>
<b>1. INNLEDNING .....</b>	<b>12</b>
1.1 NEVROTRANSMITTERSIGNALISERING .....	12
1.1.1 Eksitotoksisitet .....	13
1.1.2 Glutamat .....	15
1.1.3 NMDA -reseptorer .....	16
1.1.4 Nikotinerge acetylkolinreseptorer.....	17
1.1.5 Dopaminreseptorer.....	18
1.2 POLYKLORERTE BIFENYLER (PCB) .....	19
1.2.1 Struktur .....	20
1.2.2 Eksponering .....	21
1.2.3 Nedbrytning .....	21
1.2.4 Spredning.....	22
1.2.5 Toksisitet .....	23
1.3 ADHD .....	26
1.3.1 Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD).....	26
1.3.2 Rottemodeller for ADHD .....	29
1.3.3 Atferdsstudier av SHR-, ADD-, WKY- og SD-rotter .....	31
1.3.4 PCB og ADHD .....	34

---

1.4	HENSIKT MED OPPGAVEN .....	35
<b>2.</b>	<b>MATERIALER OG METODER.....</b>	<b>37</b>
2.1	KJEMIKALIER .....	37
2.2	DYR.....	38
2.2.1	<i>Wistar Kyoto avlet ved Harlan (WKY)</i> .....	39
2.2.2	<i>Wistar Kyoto avlet ved Charles River (ADD)</i> .....	39
2.2.3	<i>Spontaneously hypertensive Rats (SHR)</i> .....	40
2.2.4	<i>Sprague Dawley (SD)</i> .....	40
2.3	IN VIVO PCB-EKSPONERING .....	41
2.4	HOMOGENISERING OG FRAKSJONERING .....	42
2.4.1	<i>Aminosyre-ekstraksjon</i> .....	42
2.4.2	<i>Tillaging av membranpreparat for radioaktiv ligandbinding</i> .....	42
2.5	PROTEINMÅLING .....	43
2.6	AMINOSYREMÅLINGER.....	43
2.6.1	<i>Aminosyreanalyse</i> .....	44
2.6.2	<i>Effekten av PCA-proteinfelling på aminosyrekonsentrasjoner og proteinbinding</i> ....	45
2.7	RADIOAKTIV RESEPTORBINDING.....	45
2.7.1	<i>Måling av D1/D5-reseptorbinding</i> .....	46
2.7.2	<i>Metodeutvikling for måling av nikotin-reseptorer med [3H]epibatidin</i> .....	47
2.7.3	<i>Nikotinreseptor-binding med [3H]epibatidin</i> .....	48
2.7.4	<i>NMDA-reseptorbinding med [3H]MK801</i> .....	48
2.7.5	<i>Metodeutvikling for måling av nikotinreseptorer med [3H]methyllycaconitin</i> .....	49
<b>3.</b>	<b>RESULTAT.....</b>	<b>51</b>

---

3.1	METODEUTVIKLING .....	51
3.1.1	<i>Proteinbinding og effekten av PCA-proteinfelling på aminosyrekonsentrasjoner</i> .....	51
3.1.2	<i>Innledende metodeforsøk for måling av <math>\alpha_4/\beta_2</math> nikotinreseptor-subenhet</i> .....	52
3.1.3	<i>Innledende metodeforsøk for måling av <math>\alpha_7</math> nikotinreseptor-subenhet</i> .....	57
3.2	AMINOSYRER OG RESEPTORER I HJERNER AV ADHD ROTTEMODELLER OG KONTROLLER .....	63
3.2.1	<i>Måling av aminosyrekonsentrasjoner</i> .....	63
3.2.2	<i>Måling av nikotinreseptor-subenheten <math>\alpha_4/\beta_2</math></i> .....	65
3.2.3	<i>NMDA reseptor binding</i> .....	70
3.3	EFFEKT AV ORTHO-SUBSTITUERT PCB EKSPONERING IN VIVO .....	71
3.3.1	<i>Effekt av PCB eksponering på aminosyrekonsentrasjoner</i> .....	72
3.3.2	<i>Effekt av PCB på nikotinreseptor-subenheten <math>\alpha_4/\beta_2</math></i> .....	76
3.3.3	<i>Effekt av PCB på D1/D5 reseptor binding</i> .....	82
3.3.4	<i>Effekt av PCB på NMDA reseptor binding</i> .....	83
4.	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>85</b>
4.1	METODEFORSØK .....	85
4.2	AMINOSYREKONSENTRASJONER OG RESEPTORBINDING I HJERNEN FRA ADHD-ROTTEMODELLER .....	88
4.2.1	<i>Aminosyrekonsentrasjoner</i> .....	88
4.2.2	<i>Måling av nikotinreseptor-subenhetene <math>\alpha_4/\beta_2</math> med <math>[3H]</math>epibatidin</i> .....	89
4.2.3	<i>Måling av NMDA-reseptorer med <math>[3H]</math>Mk 801</i> .....	92
4.3	EFFEKT AV ORTHO-SUBSTITUERT PCB-KONGENERER IN VIVO .....	93
4.3.1	<i>Aminosyrekonsentrasjoner</i> .....	93
4.3.2	<i>Effekten av PCB180 på <math>\alpha_4/\beta_2</math> nikotinreseptor-subenhet binding</i> .....	95
4.3.3	<i>Effekt av PCB på dopaminreseptor D1/D5 binding</i> .....	96
4.3.4	<i>Effekt av PCB153 på NMDA-reseptor binding med <math>[3H]</math>Mk801</i> .....	96

---

4.4	OPPSUMMERING .....	98
4.5	FORSLAG TIL VIDERE ARBEID .....	100
	<b>KILDELISTE .....</b>	<b>101</b>

## Sammendrag

ADHD (Attention-deficit hyperactivity disorder) kjennetegnes av manglende oppmerksomhet, impulsivitet og hyperaktivitet. Omlag 80% av forekomsten er genetisk betinget, mens de resterende 20% trolig skyldes miljømessige årsaker. Eksponering av rotter under utvikling med PCB (Polyklorete bifenyler) har visst å gi lignende atferd som ses hos dyremodellen for ADHD (SHR-rotter) (Holene et al. 1998). Studier av ulykker og arbeidseksponering har vist at PCB også kan forstyrre kognitive funksjoner hos mennesker (Mariussen og Fonnum 2001).

I denne oppgaven ble to rottemodeller for ADHD, SHR og ADD, sammenlignet med kontrollrotter med normal atferd (WKY og SD) for å finne nevrokjemiske parametere som kan kobles til ADHD-atferden. I tillegg ble PCB-eksponerte rotter sammenlignet med rottemodellene for ADHD. Dette ble gjort for å undersøke om PCB-eksponering kan være medvirkende i utviklingen av ADHD.

Ved målinger av aminosyrekonsentrasjoner ble det funnet signifikant lavere aspartatkonsentrasjon og signifikant høyere glysin-konsentrasjon i hele hjerner fra SHR sammenlignet med WKY-rotter. Forskjellene ble ikke funnet i striatum. Det ble i tillegg vist at voksne SD-rotter eksponert for høye konsentrasjoner PCB180 (1000 mg/kg) hadde tilsvarende økning av glysin-konsentrasjon i hjernen, i forhold til sine kontroller.

Bindingsstudier av nikotinreseptor-subenheten  $\alpha_4/\beta_2$  ble utført på høyre og venstre hjernehalvdel og viste signifikant lavere binding i høyre hjernehalvdel i forhold til venstre hos SHR-rottene. Det ble derimot ikke funnet signifikante forskjeller i  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptorsubenhetsbinding i hjernehalvdelene hos WKY- og ADD-rotter.  $\alpha_4/\beta_2$ -Nikotinreseptor-bindingen var signifikant lavere hos SHR-rotter sammenlignet med WKY og ADD, både i total hjerne og i hippocampus. Eksponering av voksne SD-rotter for PCB180 (1000, 100 og 3 mg PCB per kg) og eksponering av unge SHR- og WKY-rotter for PCB153 (9 mg PCB per kg) viste ingen signifikant effekt på  $\alpha_4/\beta_2$ -

---

subenhet-binding i hjernen. Det ble heller ikke funnet noen signifikante forskjeller i NMDA-reseptorbinding i hippocampus fra SHR- og WKY-rotter eksponert for PCB153 sammenlignet med kontroll (ueksponerte SHR- og WKY-rotter).

Dopaminreseptor-subenhetene  $D_1/D_5$  ble undersøkt i hjernehalvdeler fra voksne SD-rotter eksponert for ulike konsentrasjoner av PCB180, men det ble ikke funnet signifikante forskjeller sammenlignet med kontroll.



---

## Forkortelser

ADD	Attention-deficit disorder, rottemodell for ADHD-PI
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolepropionsyre
ADHD	Attention-deficit hyperactivity disorder
ADHD-PI	ADHD, dominerende oppmerksomhetssvikt
ADHD-HI	ADHD, dominerende hyperaktivitet og impulsivitet
ADHD-C	ADHD, kombinert type av ADHD-PI og ADHD-HI
ARNT	aryl hydrocarbon-reseptor nuclear translocator
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintrifosfat
BCA	Bicinchonic syre
BSA	Bovint serum albumin
cAMP	Syklisk adenosin 3',5'-monofosfat
DARP-32	Fosfoprotein-32
DAT	Dopamintransportør
DPM1	Desintegrasjoner per minutt
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
GABA	Gamma-amino-smørsyre
Gln	Glutamin

---

Glu	Glutamat
Gly	Glysin
GSH	Glutation
HKD	Hyperkinetisk forstyrrelse
HPLC	High performance liquid chromatography
HSP90	Varmesjokk-protein 90
ICD-10	International Classification of Diseases
LTP	Langtidspotensiering
MAO	Monoaminoksidase
MeSO <sub>2</sub>	Methylsulfon
mGluR	Metabotrope glutamatreseptorer
nAChR	Nikotinerge acetylkolinreseptorer
NMDA	<i>N</i> -metyl <i>D</i> -aspartat
OH·	Hydroksylradikal
OPA	<i>ortho</i> -phtaldehyde
PBS	Fosfat-buffer
PCA	Perklorsyre
PCB	Polykloreerte bifenyler
ROS	Reaktive oksygenforbindelser

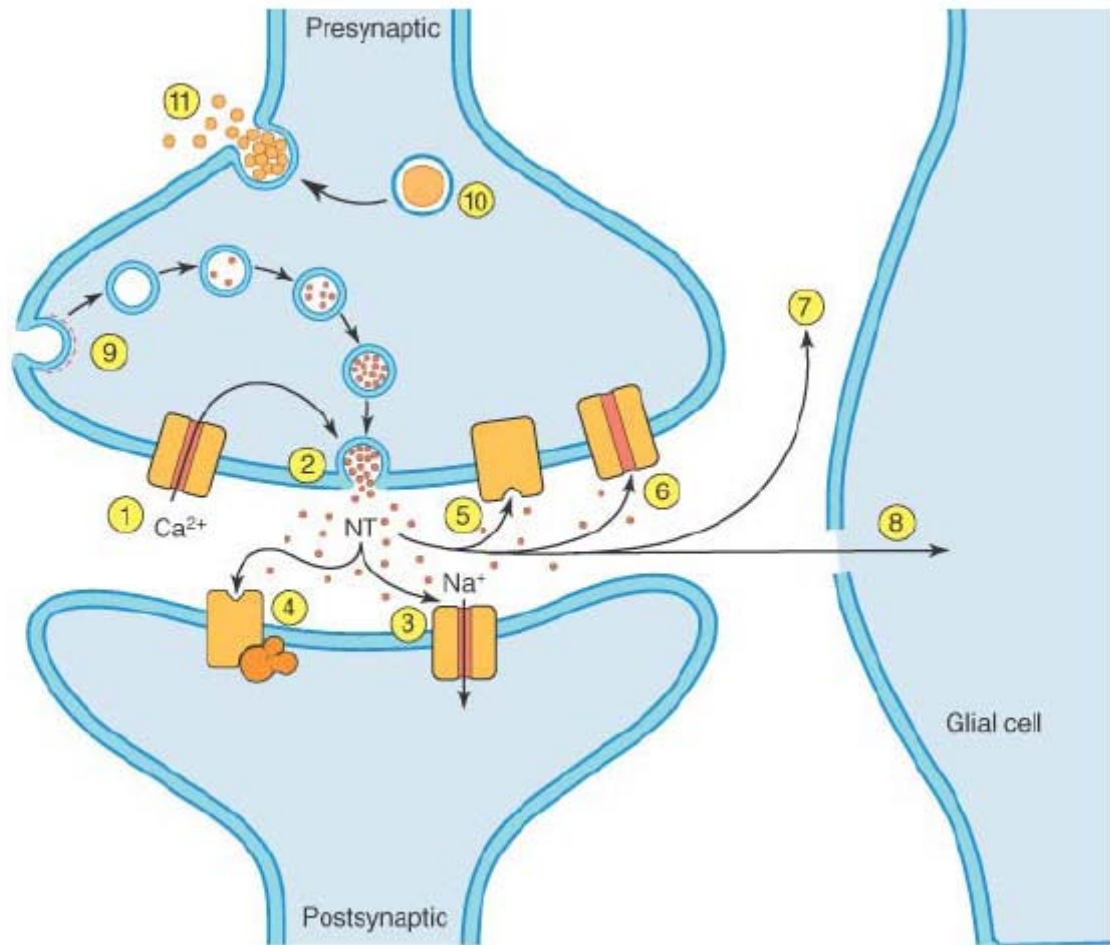
---

Retinol	Vitamin A
SEM	Standardfeil
SD	Sprague Dawley-rotter
Ser	Serin
SHR	Spontant hypertensiv rotte
SHR-SP	Spontant hypertensiv rotte disponert for slag
SNAP25	Synaptosomal-assosiert protein
Tau	Taurin
VGlut	Vesikulære glutamat-transportører
VMAT2	vesikkulær monoamin-transportør
WKY	Wistar Kyoto-rotter

# 1. Innledning

## 1.1 Nevrotransmittersignalisering

Nervesystemet hos pattedyr består av ulike celletyper som inkluderer nerveceller, gliaceller som astrocytter, myelin dannende celler (oligodendrocytter i sentralnervesystemet og schwanceller i det perifere nervesystemet), mikroglia og endotel- og ependymceller (Raine 2006). Nerveceller er ansvarlig for mottak og videreføring av impulser. Nervecellene består av en cellekropp med dendritter og et langt akson som ender i synaptiske terminaler. Dendrittene stikker ut fra cellekroppen og mottar signaler fra andre nervecellers terminaler. I presynaptiske terminaler ligger det et lager av vesikler fylt med nevrotransmitter-substanser som venter på å bli frigjort (Figur 1). Signaloverføring kan skje ved at frigjorte nevrotransmittere binder seg til post- eller presynaptiske reseptorer i nevronenes cellemembran. Mange ulike substanser kan være nevrotransmittere. Eksempler på slike stoffer er aminosyrer (glutamat, GABA), monoaminer (dopamin), neuropeptider og lavmolekylære stoffer som acetylcholin (Holz og Fisher 2006). Normalt har innsiden av cellemembranen i nevroner negativ ladning i forhold til utsiden, men under depolarisering blir innsiden midlertidig positiv på grunn av innstrømning av positivt ladde ioner som  $\text{Ca}^{2+}$ . Innstrømning av  $\text{Ca}^{2+}$  til cytosol vil stimulere membranassosierte nevrotransmittervesikler til å fusjonere med plasmamembranen ved eksocytose, slik at nevrotransmittere blir frigjort i den synaptiske spalten. Nevrotransmittere i den synaptiske spalten vil bli fjernet ved opptak i gliaceller eller post/presynaptiske nevroner (Masson et al. 1999). GABA og glysin er de viktigste inhiberende signalstoffene. Binding av disse fører til innstrømning av negativt ladde  $\text{Cl}^-$ . Dette gjør det vanskeligere å depolarisere nevronene. Glutamat er derimot den viktigste eksitatoriske nevrotransmitteren. Overstimulering av glutamatreseptorer kan få fatale konsekvenser for nerveceller og føre til eksitotoksitet.



Figur 1: Figuren viser signaloverføring ved den synaptiske spalten.

1) Depolarisering åpner spenningsensitive  $\text{Ca}^{2+}$  kanaler i den presynaptiske nerveterminalen. 2) Innfluks av  $\text{Ca}^{2+}$  gir høye intracellulære  $\text{Ca}^{2+}$  konsentrasjoner som aktiverer eksocytose av vesikler som inneholder nevrotransmittere. Frigjorte nevrotransmittere kan reagere med reseptorer i den postsynaptiske membranen. 3) Disse reseptorene kan enten være koblet direkte til ionekanaler 4) eller de kan virke gjennom sekundære budbringer molekyler som G-protein koblede reseptorer. 5) Nevrotransmittere kan også binde seg til reseptorer i den presynaptiske membranen og på denne måten kan de virke hemmende eller stimulerende på eksocytose. 6) Frigjorte nevrotransmittere kan bli tatt opp i nerveterminalen ved hjelp av transportproteiner som er koblet til  $\text{Na}^{+}$ -gradienten. 7) I tillegg kan nevrotransmittere (acetylcholin) bli inaktivert ved degradering av enzymer eller bli tatt opp og metabolisert i gliaceller (Glutamat). 9) De synaptiske vesiklene blir resirkulert ved klatrin-mediert endocytose. 10) Nevropeptider og proteiner blir lagret i større og tettere granuler. 11) Granulene frigjøres fra andre områder enn de aktive sonene etter gjentatt stimulering (2) (Holz og Fisher 2006).

### 1.1.1 Eksitotoksisitet

Eksitotoksisitet kommer fra overstimulering av glutamatreseptorer på en slik måte at nevronene kan dø. Alle eksitotoksiner er i prinsippet agonister av glutamatreseptorer i

---

hjernen og ligner strukturelt sett på glutamat. Eksitotoksisitet kan kobles til mange nevrodegenerative sykdommer (Fonnum et al. 1995). Mekanismen for eksitotoksisitet skyldes en kaskade av hendelser som skjer når det blir for mye  $\text{Ca}^{2+}$  inne i cellen. Økt intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  fører til dannelsen av frie radikaler og reaktive mellomprodukter som superoksidanionradikaler, hydroksylradikaler, hydrogenperoksid og peroksynitritt.  $\text{Ca}^{2+}$  kan skade mitokondriemembranen ved at ionet pumpes inn og ødelegger den naturlige spenningen ved depolarisering. Depolarisering av mitokondriet øker frigjøringen av elektroner fra elektrontransportkjeden, noe som øker dannelsen av oksygenradikaler.

Reaktive oksygenforbindelser (ROS) kan også dannes ved  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivering av enzymer som fosfolipase A2, xanthine-oksidase og NO-syntetase (Fonnum og Lock 2004). ROS kan binde seg til DNA, proteiner og lipider og føre til mutasjoner, skade på reparasjonssystemet for DNA, dysfunksjonelle proteiner og enzymer, lipidperoksidering eller hydrogen-fjerning fra fettsyrer (Gorman et al. 2000; Fonnum og Lock 2004). Disse skadene kan føre til nedbrytning av membraner og stans i cellens viktige funksjoner som videre kan føre til celledød. Skade på mitokondrier kan i tillegg aktivere proteiner som er viktig for apoptose (planlagt celledød trigget av lave  $\text{Ca}^{2+}$  nivåer), men dersom cellen dør ved nekrose (plutselig celledød hvor cellen sprekker, trigget av høye  $\text{Ca}^{2+}$  nivåer) kan ROS spres til nærliggende celler og skade disse også (Gorman et al. 2000).

*N*-metyl *D*-aspartat (NMDA)-reseptoren er den glutamatreseptoren som er mest involvert i eksitotoksisitet, og ved aktivering åpnes det en ione kanal for  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Na}^{+}$ . AMPA- og kainat-reseptorene har også en viktig rolle i eksitotoksisitet (Hollmann og Heinemann 1994). Ionekanalen på NMDA-reseptoren er i hviletilstand blokkert av ett  $\text{Mg}^{2+}$ -ion som hindrer innstrømning av  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Na}^{+}$ . Aktivering av AMPA- og kainat-reseptorer fører til innstrømning av  $\text{Na}^{+}$  og depolarisering av membranen, noe som øker sjansen for aktivering av NMDA-reseptoren ved at  $\text{Mg}^{2+}$ -blokkaden fjernes (Choi 1988).

---

Kroppen har et naturlig forsvarssystem som kan detoksifikere ROS. Dette innebærer enzymer som superoksid-dismutase, glutation-peroksidase, og antioksidanter som for eksempel vitamin E. Hjernen er spesielt sårbar for ROS siden den har lav aktivitet av forsvarsenzymer og i tillegg er enkelte hjernedeler rik på jern. ROS-forbindelsen superoksid kan reagere med jernholdige proteiner og frigjøre jern, som igjen kan bidra til dannelsen av det svært reaktive hydroksyl radikalet ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Mariussen et al. 2002).

### 1.1.2 Glutamat

Glutamat er den viktigste eksitatoriske nevrotransmitteren i sentralnervesystemet (Fonnum 1984; Nakanishi og Masu 1994). Tidlige forsøk av Takagaki et al. (1961) viste at glutamat-tilskudd kan forbedre mental atferd og forbedre tilstanden ved flere nevrologiske forstyrrelser som epilepsi og mental retardasjon, men det kan også virke skadelig ved overstimulering (Fonnum 1984). Glutamat-aktivering av NMDA-reseptorer er nødvendig for langtidspotensiering (LTP), som er en mekanisme for læring. LTP fører til økt plastisitet i synapser og er grunnlaget for læring og hukommelse (Myhrer 1993). Dersom det forekommer eksitotoksisitet i hippocampus kan det påvirke læring og hukommelse, siden hippocampus er et viktig område for LTP. I tillegg til hippocampus foregår LTP også i limbiske forhjerne og i det entorhinale området (Racine et al. 1983; Fonnum et al. 1995).

### Glutamatsyklus

Glutamat som frigjøres i synapsen tas opp med høy affinitet i astrocytter (Schousboe et al. 1977). I disse cellene reagerer glutamat med ammoniakk og danner glutamin ved hjelp av glutaminsyntetase og adenosintrifosfat (ATP) fra cytosol. Dette er en viktig alternativ reaksjon for å detoksifikere ammoniakk. Ammoniakk i store konsentrasjoner kan forstyrre synapsens funksjon (Norenberg et al. 1997; Sonnewald et al. 1997; Nissim 1999). Glutamin er ingen nevrotransmitter og kan derfor transporteres ut i ekstracellulærvæsken hvor det tas opp av nervecellen. Glutamat er også involvert i metabolske veier som sitronsyresyklus (TCA-syklusen) og omgjøres

der til andre aminosyrer som f. eks GABA (Waagepetersen et al. 2005; Hassel og Dingledine 2006). I nerveceller blir glutamin omgjort til glutamat ved hjelp av enzymet fosfat-aktivert glutaminase som befinner seg i mitokondriet. Glutamat i cytosol vil akkumuleres i vesikler opp til 60 – 250 mM mens det forblir svært lite i cytosol (Hassel og Dingledine 2006). Denne oppkonsentreringen skyldes vesikulære glutamattransportør-proteiner (VGlut) i vesikkelmembranen, som er proton ( $H^+$ )/glutamat-pumper. Det vil si at de pumper inn glutamat i bytte mot  $H^+$ . Det finnes i tillegg  $H^+$ -avhengige ATPaser i vesikkelmembranen som etablerer en protonbasert elektrisk gradient, slik at vesikkel-lumen blir positivt ladet og full av  $H^+$ . Denne elektriske gradienten i tillegg til lav pH verdi i vesikkel-lumen er viktige faktorer for akkumuleringen.

### 1.1.3 NMDA -reseptorer

NMDA-reseptorer er en undergruppe av glutamatreseptorer som har glutamat som sin primære aktivator men kan også aktiveres av andre agonister som aspartat. Glutamatreseptorene kan deles inn i ionotrope (NMDA-, kainat- og AMPA-reseptorer) og G-protein-koblede metabotrope reseptorer (mGluR).

NMDA-reseptorer er heteromeriske proteinkomplekser som er svært spesielle, siden det er den eneste nevrotransmitter-reseptoren som krever samtidig binding av to ulike agonister for aktivering. NMDA-reseptoren er også tregere enn andre glutamatreseptorer og krever mer stimuli for aktivering enn de andre typene (Hassel og Dingledine 2006). Det er foreløpig identifisert syv ulike NMDA-subenheter inndelt i tre familier; NR1, NR2 (A-D) og NR3 (A-B) (Nakanishi og Masu 1994; Hassel og Dingledine 2006). Hver reseptor er bygget opp av totalt to til tre ulike subenheter. De fleste funksjonelle NMDA-reseptorene består av NR1 og minst én NR2-subenhet. Det finnes også NMDA-reseptorer som består av NR1 i tillegg til både NR2 og NR3 (Kew og Kemp 2005).

NMDA-reseptoren har 6 bindings seter som påvirker åpning av ione kanaler. For aktivering finnes det bindings seter for agonistene L-glysin, L-glutamat og polyamin.



Åpning av ione kanalen fører til innstrømning av  $\text{Na}^{2+}$  og  $\text{Ca}^{2+}$  samt utstrømning av  $\text{K}^{+}$  gjennom reseptoren. For at ione fluks skal tillates krever reseptoren at både L-glysin og L-glutamat er bundet for at  $\text{Mg}^{2+}$ -blokkaden av ione kanalen skal opphøre. Når ione kanalen åpnes blir bindingssetene for  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , og  $\text{H}^{+}$  tilgjengelige. Binding av  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , og  $\text{H}^{+}$  til sine bindings seter hindrer ione fluks ved å blokkere ione kanalen. NMDA-reseptoren er normalt koblet til et kompleks ved navnet PSD-95, som fører til ansamling av NMDA-reseptorer i bestemte områder. Denne ansamlingen gjør at disse reseptorene lettere kan bli aktivert. Dette virker ved at aktivering av én reseptor gir depolarisering i nærområdet. Depolarisering fjerner  $\text{Mg}^{2+}$  fra sitt sete på NMDA-reseptorer og øker dermed sjansen for aktivering. Det er også foreslått at dopamin binding til D1-subenheten (avsnitt 1.1.5) kan endre NMDA-reseptorers sensitivitet. Dette er tenkt å være en synergistisk regulering, siden det fører til økt fosforyllering og nedsatt defosforyllering av NR1-subenheten til NMDA-reseptoren (Snyder et al. 1998).

#### 1.1.4 Nikotinerge acetylkolinreseptorer

Nikotinerge acetylkolinreseptorer (nAChR), også kalt nikotinreseptorer, er ligandstyrte ionotrope reseptorer. Reseptoren finnes i skjelettmuskler, autonome ganglier og i sentralnervesystemet. Nevrotransmitteren acetylkolin er viktig for aktivering av nAChR, men reseptoren kan også stimuleres av nikotin og andre agonister. Stimulering av nAChR er viktig for å opprettholde optimal hukommelse, læring, motorikk og påvirker atferd (Felix og Levin 1997; Marks et al. 2006; Taylor og Brown 2006). Psykiatriske lidelser som Alzheimer, Parkinsons sykdom, schizofreni, Tourettes syndrom og angst synes å være koblet til forstyrrelser av nikotinerg stimulering (Marks et al. 2006).

nAChR er pentamerer av ulike subenheter som omringer en ione kanal som er permeabel for kationer. Det er 12 kjente subenheter for nevronele nAChR ( $\alpha_{2-10}$  og  $\beta_{2-4}$ ). Det finnes flere kombinasjoner av de ulike subenhetene som danner funksjonelle nAChR. Pentamerene kan bestå av bare  $\alpha$ - eller  $\beta$ -subenheter, eller en blanding av

begge (Parker et al. 2001). Den mest utbredte nikotinreseptor-subenheten i hjernen er  $\alpha_4\beta_2$  og er lokalisert i hippocampus, cerebellum og basalgangliene i tillegg til den frontale, parietale og temporale barken (Gotti et al. 2006). Enkelte nAChR-subtyper som  $\alpha_7$  kan også påvirke dopaminfrigjøring i prefrontalbarken (Livingstone et al. 2009), som er viktig for blant annet motorisk kontroll, atferd og belønningsmekanismer (se avsnitt 1.1.5). Til de ulike nAChR-subenhetene kan det binde seg agonister eller antagonister som virker stimulerende eller inhiberende. Epibatidin er agonist for  $\alpha_4\beta_2$ -subenheten og binder seg ganske spesifikt (Lee et al. 2001). Derfor kan radioaktivt merket epibatidin brukes for å måle binding til  $\alpha_4\beta_2$ -subenhetene.

### 1.1.5 Dopaminreseptorer

Det finnes 5 ulike subtyper av dopaminreseptorer;  $D_1$ - $D_5$ . Disse kan videre deles inn i to hovedgrupper som kalles  $D_1$ - og  $D_2$ - lignende reseptorer.  $D_1$ -lignende reseptorer omfatter  $D_1$  og  $D_5$ , mens  $D_2$ -lignende reseptorer omfatter  $D_2$ ,  $D_3$  og  $D_4$ . Alle dopaminreseptorene er koblet til G-proteiner men stimulering av de forskjellige gruppene gir ulik effekt. Aktivering av  $D_1$ -lignende reseptorer stimulerer adenylyl-cyclase aktivitet og fører til dannelsen av syklisk adenosin 3',5'-monofosfat (cAMP), mens  $D_2$ -lignende reseptorer hemmer adenylyl-cyclase (Missale et al. 1998). Dannelsen av cAMP aktiverer proteinkinase som deretter fosforylerer fosfoprotein-32 (DARPP-32) og hemmer fosfatase-1. Fosforylert DARPP-32 er viktig for formidling av dopaminerge effekter (Greengard 2001).

Dopamin er et katekolamin som produseres i substantia nigra og det ventrale tegmentale området i hjernen. Denne neurotransmitteren er involvert ved Parkinsons sykdom, schizofreni og ADHD, og er i tillegg viktig for hjernens belønningssystem (Marsden 2006). Dopamin er også en forløper for noradrenalin. Dysregulering av dopamin- og noradrenalin ser ut til å være svært sentralt ved ADHD. Når vesikler frigjør dopamin til synapsen vil dopamintransportører (DAT) i plasmamembranen transportere dopaminet hurtig tilbake til cytoplasma, mens vesikkulær

---

monoamintransportør (VMAT) transporterer cytoplasmisk dopamin inn i vesikler (Miller et al. 1999). DAT og VMAT2 er viktige for normal dopaminfunksjon og resirkulering av dopamin mens monoaminoksidase (MAO) og katekol-*O*-metyltransferase (COMT) er ansvarlig for degradering av dopamin. Metylfenidat og D-amfetamin er legemidler som er brukt ved behandling av ADHD, og virker ved å blokkere dopamintransportører i plasmamembranen slik at det blir økt konsentrasjon av dopamin i den synaptiske spalten, D-amfetamin kan også transporteres inn i cytoplasma i bytte med intracellulært dopamin (Volkow et al. 1998; Solanto 2002).

Dopaminreseptorer finnes hovedsakelig i hjernen og danner tre viktige nervebaner (Rang et al. 2003; Kuhar et al. 2006). Den ene av disse er den nigrostriatale nervebanen. Denne er dannet med cellekropper i substantia nigra og aksoner som går via den mediale forhjernebunten (MFB) og har nerveterminaler i corpus striatum. Videre har vi den mesolimbiske nervebanen, hvor cellekroppene danner grupper i det ventrale tegmentale området i midthjernen. Deres aksoner går via den mediale forhjerne bunten og ender opp i deler av det limbiske systemet, som nucleus accumbens, amygdala og den frontale cortex. Den siste nervebanen er det tuberohypofysale system og har korte nevroner som går fra ventrale hypotalamus til eminentia mediana og hypofysen. De ulike nervebanene er ansvarlig for ulike funksjonelle aspekter som motorisk kontroll (nigrostriatale system), atferd (mesolimbiske og mesocorticale system) og endokrin kontroll (tuberohypofysale system) (Rang et al. 2003).

## 1.2 Polyklorerte bifenyler (PCB)

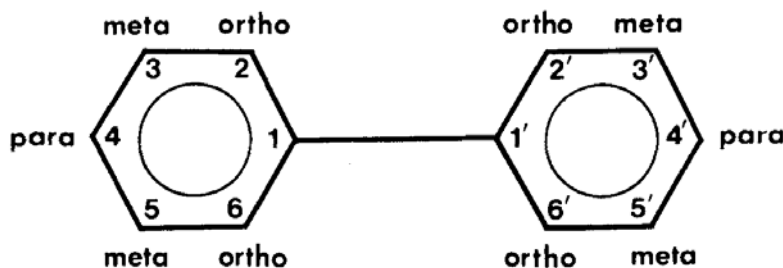
Polyklorerte bifenyler (PCB) er xenobiotiske industrikjemikalier som ble utviklet tidlig på 1920-tallet. Stoffet viste seg å være ekstremt persistent; termostabilt, lipofilt og resistent mot biologisk nedbrytning noe som var årsaken til at PCB ble brukt i materialer (Mariussen et al. 2001). PCB ble mye brukt i blant annet elektriske installasjoner og produkter som maling, smøremiddel, lim, isolasjon i bygninger og

som plastmykner. På 1960-tallet oppdaget Jensen (1966) at PCB var spredt i naturen og siden den gang har nivåene bare økt (Risebrough et al. 1968; Koeman et al. 1969; Fonnum et al. 2006). I 1970-årene ble det kartlagt negative helseeffekter (Flick et al. 1965; Vos og Koeman 1970; Rehfeld et al. 1971) og i 1980 ble ny bruk av stoffene forbudt i den industrialiserte del av verden. Siden da har det kommet nye forbud mot bruk av diverse PBC-holdige produkter. At PCB er svært fettløselig, lite reaktivt og persistent gjør at stoffet biomagnifiseres oppover i næringskjedene (Mariussen et al. 2001; Bjerregaard 2005). På grunn av at store mengder PCB allerede er spredt i naturen utgjør PCB et stort problem.

### 1.2.1 Struktur

PCB-molekylenes struktur består av to klorerte bifenylinger hvor antall kloratomer og deres plassering kan variere. Stabiliteten til molekylene øker proporsjonalt med mengden klor (Safe 1984). Plasseringen av kloratomene i *ortho*-, *meta*- eller *para*-posisjon har stor betydning for deres toksisitet (Figur 2). Teoretisk sett er det mulig å lage 209 forskjellige kongenerer, og av disse er omkring 130 blitt påvist i kommersielle produkter (Bjerregaard 2005). Alle 209 kongenerer er blitt framstilt syntetisk. Syntese av PCB kan utføres ved å tilføre Cl<sup>-</sup> til bifenylinger ved hjelp av en katalysator som jernspon eller jernklorid. Navnet til hver enkelt PCB-kongenerer blir gitt ut fra antall kloratomer og deres posisjon.

Enkelte PCB-molekyler kan oppnå en plan konformasjon ved at elektronskyen fra dobbeltbindingene i de aromatiske ringene blir fordelt ut over hele molekylet. Ved substitusjon med ett eller to kloratomer i *ortho*-posisjon vil de to fenylingene fordreies i forhold til hverandre, siden klorometet på grunn av sin størrelse tvinger den motsatte fenylingen ut av planet (Bjerregaard 2005).



*Figur 2: Struktur av bifenyl-skjelett. Kloratomer kan være bundet ved posisjonene 2-6. Stabiliteten avgjøres av antall kloratomer og posisjonen til kloratomene i ortho-, meta- eller para-posisjon kan bestemme PCB-kongenerenes giftighet. Hentet fra Safe (1984)*

### 1.2.2 Eksponering

I menneskekroppen er det ingen kjente mekanismer for utskilling eller nedbrytning av PCB, og siden PCB er svært fettløselige molekyler vil de ansamles i fettrikt vev. Den viktigste kilden for menneskelig PCB-eksponering er gjennom matvarer som fet fisk, skalldyr, kjøtt, lever, egg og melkeprodukter (La Rocca og Mantovani 2006). Men det kan også skje ved inhalering av forurenset luft eller ved hudkontakt. Et stort problem er at PCB kan overføres fra mor til foster via placenta og senere via brystmelk (Bush et al. 1984). Dette kan dermed gi barn store mengder PCB i ung alder.

### 1.2.3 Nedbrytning

Nedbrytning og omgjøring av PCB i naturen avhenger av både kloreringsgrad og substitusjonsmønster. I noen pattedyr og fugler kan enkelte PCB-kongenerer med minst to nabostilte hydrogenatomer omsettes ved at molekylet gjøres mer vannoppløselig. Dette foregår ved at enzymet aryl hydrokarbon-hydroksylase katalyserer hydroksylering av PCB. Metaboliseringen går langsomt og omsetningstiden øker med økende grad av klorering (Bjerregaard 2005).

I atmosfærisk vanndamp kan PCB reagere med hydroksylradikaler og sakte nedbrytes. Denne nedbrytningsmekanismen gir PCB-molekyler halveringstid som varierer fra 10 dager (monoklor-bifenyl) til 1 ½ år (heptaklor-bifenyl) (Bjerregaard

---

2005). Det finnes også mikrobielle nedbrytningsmekanismer i jord som foregår ved aerob degradering, hvor enkelte PCB-kongenerer kan bli nedbrutt. Mikrobiell nedbrytning foregår ved hydroksylering etter at den ene ringen er spaltet, og går hurtigere jo færre kloratomer molekylet inneholder. I vann og sedimenter kan PCB kun brytes ned ved abiotiske prosesser (Bjerregaard 2005). I vannfase og snø kan PCB bli nedbrutt ved fotolyse hvor karbon-klor-bindingen blir brutt. Halveringstiden ved fotolyse er variabel og kan være fra måneder til år. Halveringstiden er en til to ganger lengre i snø enn i overflatevann (Matykiewiczova et al. 2007).

I tillegg forskes det på nye metoder som kan øke nedbrytningen av PCB (Koller et al. 2000; Stach et al. 2000; Noma et al. 2007). Blant annet er det funnet en metode som effektivt skal minske PCB-innholdet i jord (Mitoma et al. 2009).

#### **1.2.4 Spredning**

I varmere strøk vil PCB kunne fordampe og transporteres med luftstrømmer. I nord blir atmosfæren så kjølig at PCB kondenseres og faller ned. På grunn av dette kan man se at PCB finnes i høye konsentrasjoner i arktiske strøk (Bjerregaard 2005). Siden PCB er lite vannløselig vil den PCB-mengden som er i vannet for det meste finnes i sedimentet og sedimentlevende organismer i stedet for i de frie vannmassene. Oppvirvlet PCB som eventuelt måtte befinne seg i de frie vannmasser vil raskt kunne konsentreres i filtrerende organismer som blåskjell og alger (Voie et al. 2002). PCB-mengdene opphopes videre hos fisk som spiser bunndyr og alger, og hos fisk som spiser fisk. Fra de marine dyrene kan PCB overføres til landlevende dyr via næringskjeden. Oppkonsentrering av PCB i nordområdene gjør at fisk, fugler, sel, isbjørn og andre dyr vil inneholde store konsentrasjoner av PCB, som vil utgjøre en risiko for formering og overlevelse. Konsumering av for eksempel fet fisk, måke-egg og sel fra arktiske strøk vil derfor være av stor betydning for PCB-akkumulering.

### 1.2.5 Toksisitet

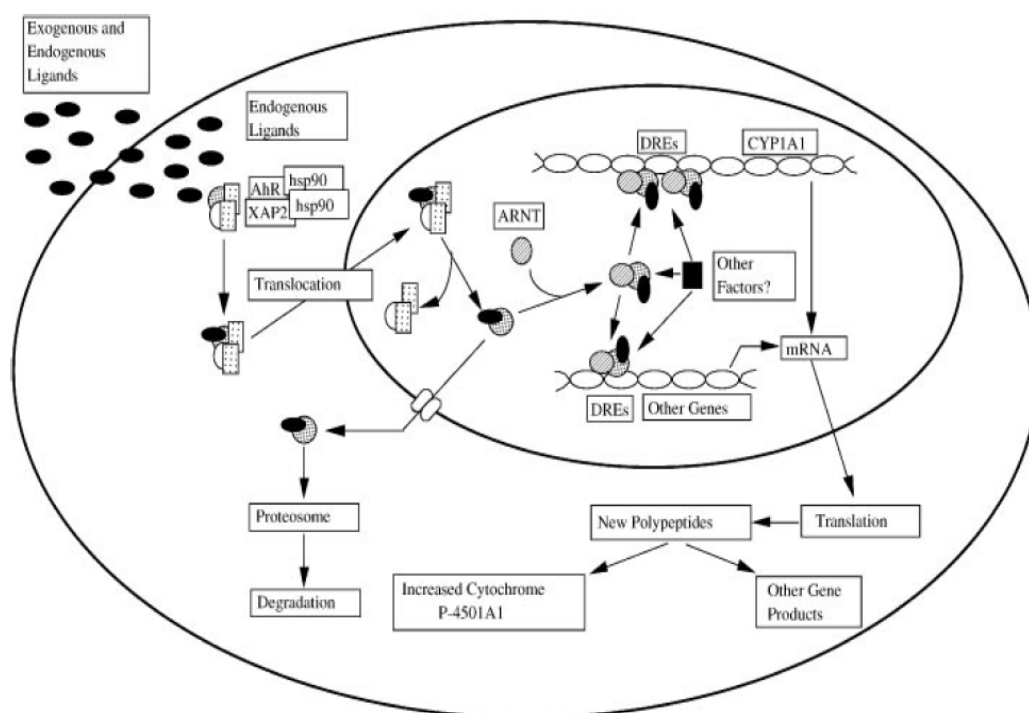
PCB-eksponering av primater og gnagere har blitt vist å gi endrede signaliseringsmekanismer i nervesystemet. Dette kan videre føre til dårlig hukommelse, lærevansker og motoriske problemer (Seegal 1996; Mariussen og Fonnum 2006). Det er viktig å merke seg at ulike PCB-kongenerer og PCB-blandinger kan gi forskjellig toksisk virkning. Effekten av PCB-eksponering er også avhengig av utviklingsstadiet individet befinner seg på ved eksponering (Seegal 1996).

Studier har vist at både planare og ikke-planare PCB-molekyler kan forstyrre kalsium-homeostasen og indusere produksjon av ROS i nerveceller (Voie og Fonnum 2000; Mariussen et al. 2002). Dannelsen av ROS kan foregå ved at PCB fosforyleres og aktiverer NADPH-oksidase. ROS kan virke som budbringere i nervesystemet, men kan også skade cellen i store mengder. Det har også blitt vist at PCB-indusert ROS-dannelse kan være koblet til NMDA-reseptoren. Dette skjer trolig ved at NMDA-ione kanaler åpnes og slipper inn kalsium (Mariussen et al. 2002). Forstyrret kalsium-homeostase vil kunne føre til at elektrongradienten i mitokondriet blir defekt slik at elektroner lekker ut i cytosol (se avsnitt 1.1.1). Dersom det er høy konsentrasjon av ROS kan viktige celle-strukturer, enzymer og spesielt flerumettede fettsyrer som inngår i lipidmembraner i hjernen skades slik at cellen dør (Mariussen et al. 2002; Mariussen og Fonnum 2006). Immunsystemet har også blitt påvist å være følsom for PCB. Dette skjer ved at PCB gir økt intracellulært kalsium som forstyrrer den intracellulære signaliseringen. Dette resulterer i økt ROS-dannelse i, som videre dreper immunceller som granulocytter (Voie og Fonnum 2000). Forsøk av Voie et al. (2000) har vist at kun *ortho*-substituerte PCB-molekyler er i stand til å aktivere respirasjonssvikt i granulocytter. Effektiviteten til kongenerene avhenger også av størrelsen (økt overflate gir mindre effekt) i tillegg til antall *ortho*-substitusjoner.

Dioksinlignende PCB-kongenerer (koplanare PCB-molekyler) kan indusere økt produksjon av leverenzymer ved å binde seg til aryl hydrokarbon-reseptoren (AhR)(Figur 3). AhR-induserende PCB-molekyler er særlig ikke-*ortho*-substituerte

PCB-isomerer med 4-6 kloratomer i *meta*- og *para*-stilling. AhR er koblet til varmesjokkprotein 90 (Hsp90) og finnes i cellenes intracellulærvæske. PCB har enkel tilgang til AhR på grunn av sin fettoppløselighet. Når PCB binder seg til AhR frigjøres Hsp90 og PCB-AhR-komplekset transporteres inn i cellekjernen. Frigjøring av Hsp90 gjør at bindingssetet for ARNT(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)-bindingsprotein blir ledig. PCB/AhR-komplekset binder seg til ARNT som videre kan bindes til DNA og virke som en transkripsjonsfaktor. Genene som blir aktivert er spesielt gener som koder for enzymer involvert i biotransformasjon av fremmedstoffer. Dette kan føre til økt omsetning (detoksikering; lavere giftighet) og bioaktivering (gjøres mer toksiske) av fremmedstoffer (Bjerregaard 2005).

Eksposering for store mengder koplanare PCB-molekyler kan også gi klorakne, hyperpigmentering, teratogenese og karsinogenese i tillegg til å virke forstyrende på hormonbalansen, immunsystemet og reproduksjonssystemet (Nebert 1989; Safe 1990).





*Figur 3: PCB kan aktivere Ah-reseptoren og føre til transkripsjon av ulike gener (Denison og Nagy 2003).*

PCB kan også føre til vevsendringer og dysfunksjon i leveren som fibrose og nekrose. Dette kan trolig skyldes endret innhold av lipid, kolesterol, porfyrin og vitamin A (retinol). Forstyrrelse av tyroid- og retinolhomeostasen er av de mest følsomme fysiologiske effektene av PCB og er funnet hos forsøksdyr (Durham og Brouwer 1989). Dette kan skyldes at PCB induserer produksjonen av enzymer som er involvert i tyroidhormonkonjugering og metabolisering av retinol. Dersom det foregår induksjon av disse enzymene i leveren kan det påvirke sirkulerende tyroidhormoner og retinol. Påvirkning i leveren vil også påvirke konsentrasjonen av disse stoffene i målorganet. Endringer av tyroidhormoner kan ha alvorlige konsekvenser for skjoldbruskkjertelen og dens funksjoner. Skjoldbruskkjertelen er blant annet viktig for normal utvikling av hjernen. Tidlige forstyrrelser kan derfor påvirke hørsel, motorikk og intellekt. Hydroksylerte PCB-molekyler, også kalt tyroksin-lignende PCB, er funnet hos pattedyr, fugler og fisk. Tyroksin-lignende PCB kan binde seg kompetitivt til transportmolekylet for tyroidhormon og retinol (TTR-retinol-bindene proteinkompleks) i plasma, og kan på denne måten hemme transport av disse substansene (Maervoet et al. 2004; Fisk et al. 2005). Metylsulfon( $\text{MeSO}_2$ )-PCB er funnet i arktiske dyr, og har blitt vist å kunne påvirke østrogen-, tyroid-, og glukokortikoidhormon-avhengige prosesser i forsøksdyr og in-vitro forsøk (Letcher et al. 2002).

I kroppsvev fra pattedyr, fugler og fisk er det de ikke-planare PCB-molekylene som dominerer (Mariussen et al. 2001). Disse kan som planare-PCB-molekyler være med på initiering og promosjon av kreft. Det er mye som tyder på at kognitive forstyrrelser skyldes ikke-planare orto-substituert-PCB-kongenerer framfor planare-kongenerer (Faroon et al. 2001). Schantz et al. (1997) fant ut at *ortho*-PCB kunne reagere med ryanodin sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -kanaler (ryanodinreseptorer) *in vitro* og føre til  $\text{Ca}^{2+}$ -ubalanse. Ryanodin reseptorer er det mange av i hjernen og PCB indusert  $\text{Ca}^{2+}$ -

---

ubalanse vil kunne ødelegge for  $\text{Ca}^{2+}$ -signalisering i nevroner som videre gir endret nevrokjemisk atferd (Schantz et al. 1997).

## 1.3 ADHD

### 1.3.1 Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD)

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) rammer for det meste barn og er karakterisert av hyperaktivitet, impulsivitet og redusert oppmerksomhet. Dette skaper store problemer i skolen, i tillegg til at problemene ofte vedvarer inn i voksenlivet (Biederman og Faraone 2005). ADHD-pasienter har økt risiko for psykiske problemer av forskjellig slag, kommer lettere i konflikt med loven og har økt risiko for rusmisbruk (Barkley 2002; Mannuzza og Klein 2008). I forskningsmiljøer er det bred enighet om at det dopaminerge systemet er involvert ved ADHD, noe som støttes av blant annet hjerneavbildnings-studier og den medikamentelle behandlingen som øker tilgjengeligheten av dopamin og noradrenalin i synapser (Biederman og Faraone 2005). Studier har vist at ADHD har en genetisk komponent som er ca 80% (Biederman og Faraone 2005). Man har imidlertid ikke kunnet påvise nøyaktig hva denne komponenten består av, men flere enkeltgener har blitt identifisert (Biederman og Faraone 2005). Den genetiske komponenten kan også innebære en sårbarhet for miljøpåvirkninger som for eksempel eksponering for kjemikalier, som kan bidra til utviklingen og omfanget av ADHD-symptomene.

Fravær av synaptosomalt-assosiert protein (SNAP25) som er involvert i synaptisk vesikkeltransport, har blitt vist å føre til hyperaktivitet i mus som mangler dette genet (Heyser et al. 1995). Hjerneavbildnings-studier av voksne med ADHD har vist redusert dopamintransportør-binding (Biederman og Faraone 2005). Dopamin er en forløper for noradrenalin og dysregulering av dopamin- og noradrenalin ser ut til å være svært sentralt ved ADHD.

---

Nevrofysiologiske studier og hjerneavbildnings-studier har vist at ADHD er assosiert med endringer i prefrontal cortex og dens koblinger til cerebellum og basalgangliene hvor spesielt striatum er involvert (Biederman og Faraone 2005; Arnsten 2006). Prefrontal cortex regnes for å være involvert i kompleks kognitiv oppførsel som oppmerksomhet, arbeidsminne, besluttsomhet og evnen til å regulere sosial oppførsel (Frith og Dolan 1996; Arnsten 2006). Cerebellum er viktig for motorikk, men også for kognitive og følelsesmessige funksjoner som oppmerksomhet, oppgave-endring/kognitiv endring, reaksjonstid, midlertidig informasjonsbearbeidelse, planlegging og verbalt arbeidsminne (Bartolo et al. 2009; Bechtel et al. 2009). Alle funksjonene til cerebellum som er nevnt ovenfor er vist å være mangelfulle hos individer med ADHD (Bechtel et al. 2009).

Flere studier viser at graviditets og fødselskomplikasjoner øker risikoen for ADHD. Komplikasjonene kan skyldes svangerskapsforgiftning, krampeanfall, dårlig helse hos mor, mors alder, sen modning, lang fødsel og stress hos foster før fødsel. Kronisk surstoffmangel er en komplikasjon hvor det ofte er sett korrelasjon med ADHD. Dette kan skyldes at basalgangliene er meget sensitiv for surstoffmangel. Basalgangliene er hjernedelen med flest dopaminerge synapser og surstoffmangel i denne hjernestrukturen har blitt vist å gi langvarige effekter på dopaminerge funksjoner. Studier har vist at alkoholinntak hos mødre fører til atferdsmessige og kognitive problemer i tillegg til lærevansker, som kan representere ADHD symptomer. Eksponering av fosteret for nikotin og andre toksiner i sigarettøyk, ved at moren røyker, kan skade hjernen ved kritiske tidspunkter under utviklingen. I tillegg har studier av gravide mus vist at eksponering for nikotin gir hyperaktive avkom. Dette kan kobles til ADHD ved at nikotin-reseptorer regulerer dopaminerg aktivitet, og kan dermed gi unormal dopaminerg signalisering. Rutter's indeks for psykososiale problemer viser at det også er sammenheng mellom familiemiljø og ADHD (Biederman og Faraone 2005). I Rutter's indeks omtales en rekke miljøfaktorer som korrelerer med økende mentale forstyrrelser hos barn, som for eksempel alvorlige ekteskapsproblemer hos foreldrene, lav sosial klasse, stor

familiestørrelse, kriminell far, mor med mentale forstyrrelser og fosterhjem-plassering.

Diagnostisering av ADHD følger retningslinjene som kalles DSM-IV (Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders) og brukes mye i USA. Derimot har Europa et eget sett med kriterier som følger ICD-10 (International Classification of Diseases)-retningslinjer. Diagnoser som blir stilt med ICD-10-retningslinjer for barn med hyperaktivitet, oppmerksomhetssvikt og impulsivitet blir ikke kalt ADHD, men hyperkinetisk forstyrrelse (HKD) (Biederman og Faraone 2005). Det trengs færre oppfylte kriterier for å få stilt diagnosen ADHD enn HKD se Tabell 1. Og det er hovedsakelig betegnelsen ADHD som blir brukt om individer med denne lidelsen. I følge DSM-IV er det tre undergrupper av ADHD; ADHD dominert av uoppmerksomhet (ADHD-PI/ADD), ADHD dominert av hyperaktivitet og impulsivitet (ADHD-HI), og ADHD hvor ADHD-PI og ADHD-HI er kombinert (ADHD-C). Fordelingen av undergruppene av ADHD er ofte kjønnsrelatert, ved at ADHD-C er mest vanlig blant gutter mens ADHD-PI er mer vanlig blant jenter (Sagvolden et al. 2008).

*Tabell 1: Forskjeller mellom USA og Europas kriterier for ADHD-diagnose hentet fra Biederman et al. (2005).*

	USA DSM-IV ADHD	Europa ICD-10 HKD
Symptomer	<p>Én eller begge av følgende:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Minst seks av ni symptomer på uoppmerksomhet</li> <li>2. Minst seks av ni symptomer på hyperaktivitet eller impulsivitet</li> </ol> <p>Kriteriene må være tilstede i mer enn én situasjon</p>	<p>Alle av følgende:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Minst seks av åtte symptomer på uoppmerksomhet</li> <li>2. Minst tre av fem symptomer på hyperaktivitet</li> <li>3. Minst én av fire symptomer på impulsivitet</li> </ol> <p>Kriteriene må være tilstede i mer enn én situasjon</p>

Uoppmerksomhet i denne sammenheng vil si vansker med å opprettholde oppmerksomheten, økt mottagelighet for distraksjoner og eventuelt økt mottagelighet

---

for innblanding (Arnsten 2006). Det er tydelig at symptomene dempes med alderen og i 30-40 årene vil de fleste som har hatt ADHD i sin barndom ikke lenger kunne fylle kriteriene for diagnosen ADHD. Omtrent halvparten vil fortsatt ha forstyrrende symptomer som er i samsvar med DSM-IV (Biederman og Faraone 2005).

### **1.3.2 Rottemodeller for ADHD**

Bruk av dyremodeller i forskning gir flere fordeler, blant annet har de enklere nervesystem, atferden er lettere å analysere, de har ofte genetisk homogenitet, det er lettere å kontrollere omgivelsene og flere kliniske innblandinger er mulig sammenlignet med kliniske tilfeller. Dyremodellen bør etterligne individer med forstyrrelsen med hensyn til etiologi, biokjemi, symptomer og behandling (Sagvolden et al. 2005). ADHD er beskrevet i avsnitt 1.3.1 og karakteriseres av hyperaktivitet, impulsivitet og oppmerksomhetssvikt. Siden diagnosen for ADHD stilles ut i fra observert atferd, er også valideringskriteriene for en ADHD-dyremodell basert på atferd. Følgende kriterier må derfor være oppfylt for en god ADHD-modell (Sagvolden et al. 2005):

- Modellen må ha samme fundamentale atferdskjennetegn som kreves av ADHD-diagnosen.
- Det må være overensstemmelse med det fundamentale eller hypotiserte patofysiologiske grunnlaget for sykdommen.
- Ut i fra dyremodellen bør det være mulig å forutse ukjente aspekter rundt atferd, genetikk og nevrobiologi ved sykdommen.

I dag betraktes spontant hypertensive rotter (SHR) som den beste av de tilgjengelige dyremodellene for ADHD av kombinert type (ADHD-C). Dette er en genetisk modell; det utføres intet inngrep eller behandling for at dyrene skal få ADHD-symptomer. Symptomene som disse SHR-rottene viser i atferdstester inkluderer hyperaktivitet, impulsivitet og redusert oppmerksomhet (Sagvolden et al. 2005).

Dette fører til at ADHD-rottemodellene viser redusert læringsevne i forhold til kontroll-rottene (Wistar Kyoto (WKY) og Sprague Dawley (SD)) (Terry et al. 2000). Det har også blitt oppdaget en ny type Wistar-rotte som kan benyttes som modell for ADHD-PI, og som har blitt gitt betegnelsen ”attention-deficit disorder” (ADD)-rotter (Sagvolden et al. 2008). Det er foreslått at ADHD-C og ADHD-PI er to ulike forstyrrelser med ulikt sykdomsopphav (Sagvolden et al. 2008). Atferdstesting av de ulike rottemodellene er beskrevet nærmere i avsnitt 1.3.3. Eksponering av normale rotter under utvikling med di-*ortho*-substituerte PCB-kongenerer har blitt vist å gi endret atferd som ligner på atferden som sees hos ADHD-rottemodellen SHR (Holene et al. 1998). Vår arbeidshypotese er at lidelsen ADHD skyldes endringer i belønningsmekanismer, som er sekundære til forandringer av nevrotransmitter-signalisering i hjernen.

### **Spontant hypertensive rotter (SHR)**

Spontant hypertensive rotter (SHR) oppfyller flere valideringskriterier for kombinert type ADHD (ADHD-C) og har vist seg å være både mer uoppmerksom, hyperaktiv og impulsiv i atferdstester enn WKY- og SD-rotter (Sagvolden et al. 2008).

Metylfenidat og D-amfetamin er legemidler brukt ved ADHD, disse har også vist å gi redusert hyperaktivitet og impulsivitet ved behandling av SHR-rotter (Sagvolden et al. 2005). Alderen hos SHR-rotter er av stor betydning siden SHR-rotter starter å utvikle høyt blodtrykk når de er omkring 7 uker gamle (Nabha et al. 2005). Høyt blodtrykk kan ha innvirkning på utviklingen av kognitive svekkelser og demens, hjerneatrofi, tap av nerveceller og gliale reaksjoner (Amenta et al. 2003). For å være på den sikre siden bør SHR-rotter som skal brukes til å forske på ADHD derfor ikke benyttes etter en alder av 4-5 uker (Sagvolden et al. 2005). Hyperaktiviteten og impulsiviteten hos SHR-rottene blir heller ikke borte ved bruk av blodtrykksenkende medikamenter (Sagvolden et al. 2005; Sagvolden et al. 2008). Det fenotypiske uttrykket av hyperaktivitet er uavhengig av blodtrykk hos SHR-rottene benyttet i denne oppgaven, siden det ble benyttet 5 uker gamle rotter.

---

## **Attention-deficit disorder (ADD)-rotter**

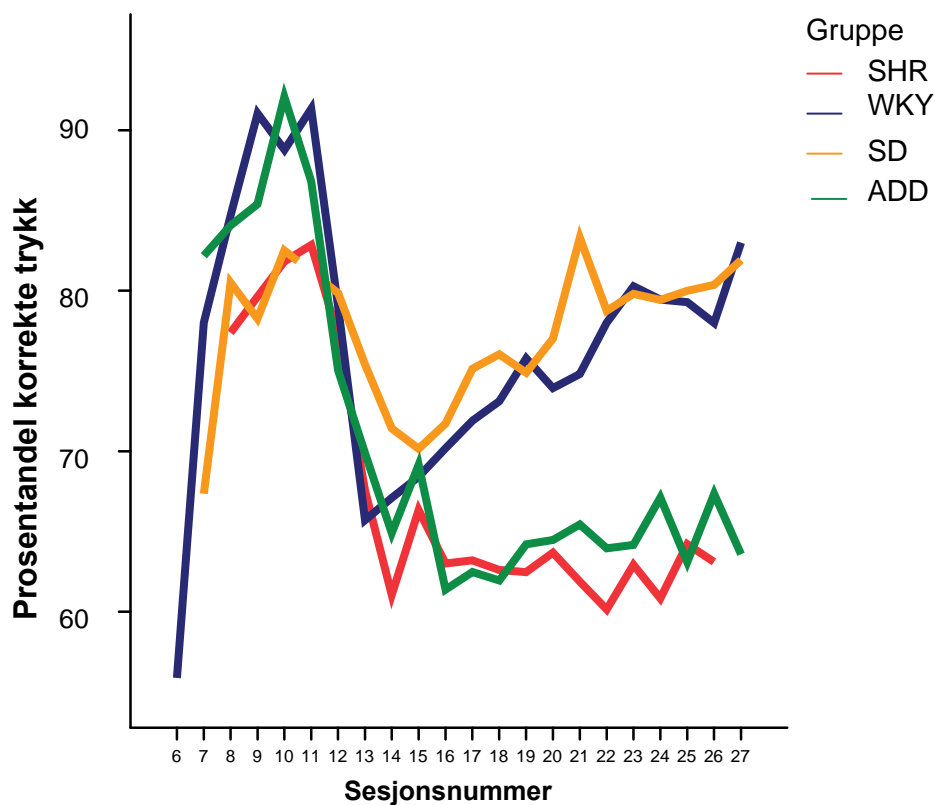
Attention-deficit disorder (ADD)-rotter avlet ved Charles River-laboratoriet ble opprinnelig bestilt som WKY-kontroller og var forventet å ha samme atferd som WKY-rotter fra Harlan Laboratories (kontroll). Derimot viste ADD-rottene i atferdsforsøk oppførsel som lignet på ADHD-PI, med dominerende oppmerksomhetssvikt i forhold til kontrollgruppen, men ikke hyperaktivitet eller impulsivitet (Sagvolden et al. 2008). Undersøkelse av genomet til ADD-rottene viste 33.5% forskjell fra WKY-rotter fra Harlan (kontroll) (Sagvolden et al. 2008). Av den grunn ble WKY-rottene fra Charles River-laboratoriet gitt navnet ADD-rotter og brukt som rottemodeller for ADHD-PI.

### **1.3.3 Atferdsstudier av SHR-, ADD-, WKY- og SD-rotter**

Atferdsstudier av SHR, ADD, WKY og SD-rotter har blitt gjort av en samarbeidende gruppe. Arbeidet ble utført i laboratoriet til professor Terje Sagvolden ved Avdeling for fysiologi, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo. Resultatene fra atferdstesting har nylig blitt publisert (Sagvolden et al. 2008) og viser at det er tydelig forskjell mellom rottemodellene for ADHD, SHR og ADD, sammenlignet med WKY- og SD-rottene (kontroll). Til atferdstesting ble det brukt skinnerbokser som inneholdt to pedaler med hver sin lampe over. Mellom pedalene var det en luke hvor belønning ble delt ut. Hvilken pedal som var riktig å trykke på for å få belønning ble markert ved at en lampe ble tent over pedalene. Hver gang en belønning ble delt ut ble en lampe inne i belønningsluken tent slik at rotten skulle oppdage belønningen. Belønning i dette tilfellet var en vanndråpe. For at dyrene skulle være motiverte for å få belønning hadde dyrene ikke drukket vann på omtrent 22 timer før forsøksstart. Rottene ble i starten lært opp til å trykke på riktig pedal for å få en belønning. Etter at alle rottene hadde forstått sammenhengen mellom pedaltrykk og belønning kunne den virkelige atferdstesting begynne. Under de første sesjonene ble det gitt belønning for hvert korrekte trykk. Men etter hvert ble det kun gitt en belønning innen et tidsintervall (normalt 180 sekunder). Under atferdstesting ble

det registrert 3 ulike parametre som korrekte-trykk, totalt antall trykk og trykk med kort interrespons tid.

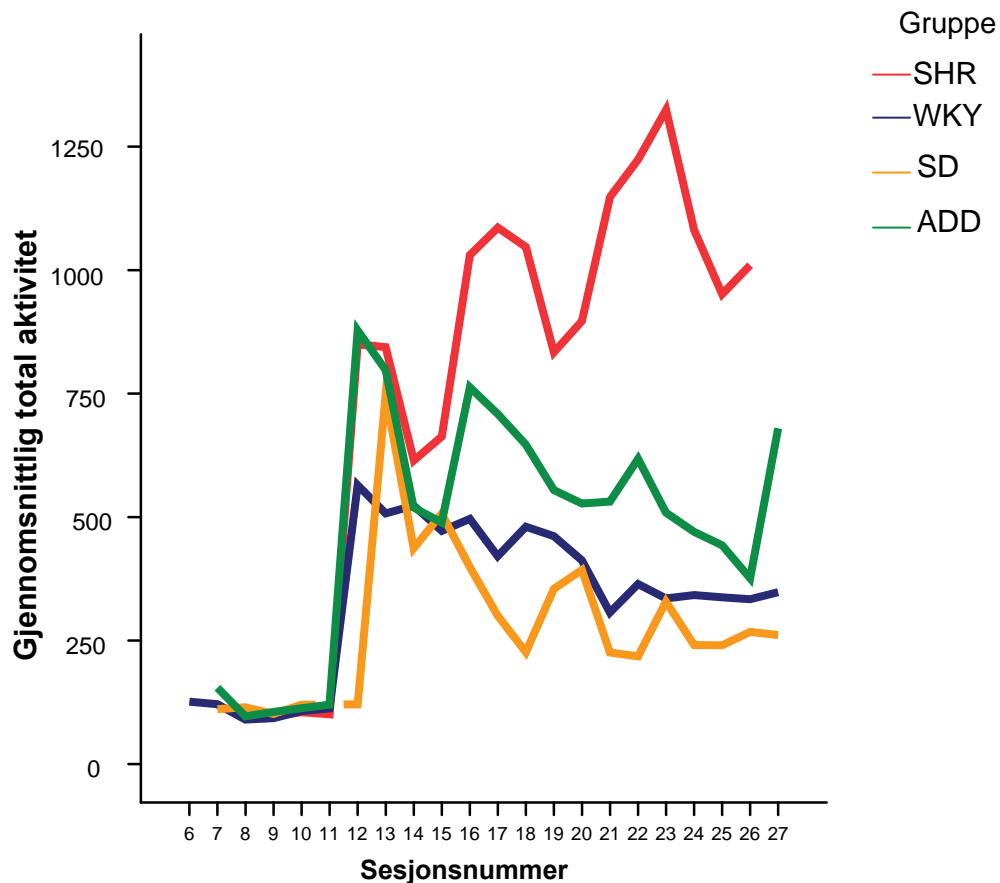
Prosentandel korrekte trykk for rottene er presentert i Figur 4 og er et mål for oppmerksomhet. I starten da belønningen kom umiddelbart etter pedaltrykk ser man at alle rottemodellene har omtrent like mange riktige trykk. Etter at belønning bare ble gitt i intervaller (sesjon > 12) ser man at SHR- og ADD-rottene gjorde det betydelig dårligere enn WKY- og SD-rottene.



Figur 4: Prosentandel korrekte trykk på pedalen utført av SHR-, ADD-, SD- og WKY-rotter (n=8). Prosentandel korrekte trykk er et mål for oppmerksomhet.

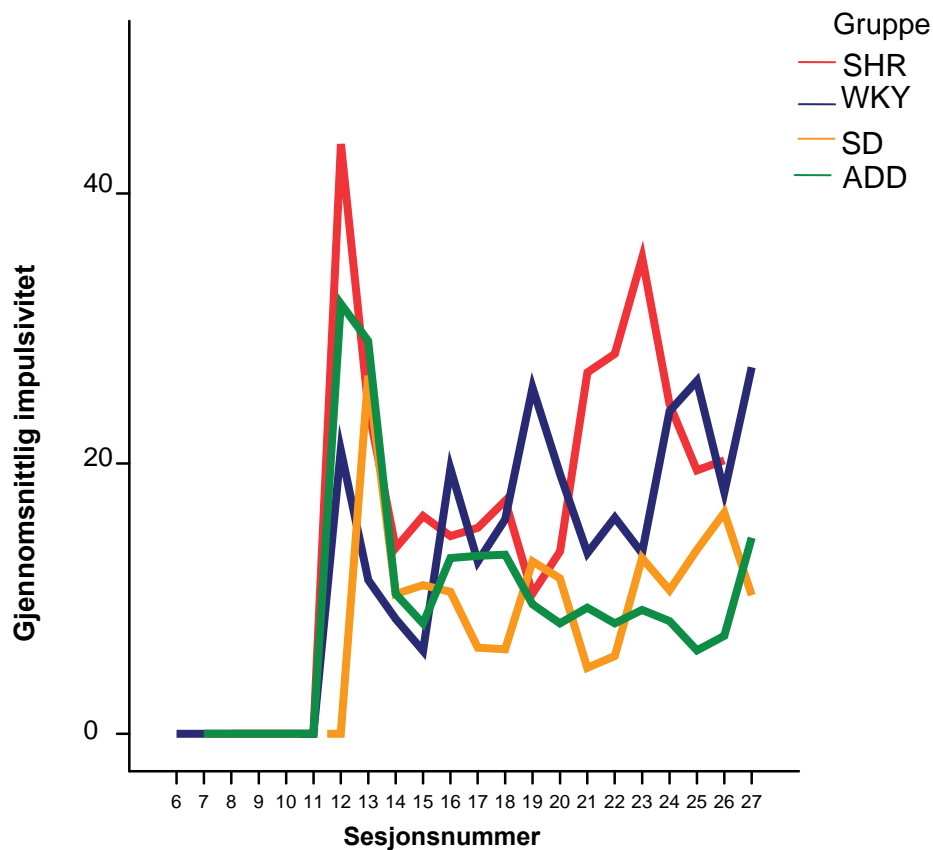
Figur 5 viser totalt antall trykk som er et mål for hyperaktivitet. I starten da belønningen kom med en gang ser man at alle rottemodellene har omtrent like stor aktivitet. Etter at belønning bare ble gitt i intervaller (sesjon > 12) ser man at SHR-rottene er betydelig mer aktive enn ADD-, WKY- og SD-rottene.





Figur 5: Total aktivitet av SHR-, ADD-, WKY- og SD-rotter ( $n = 8$ ). Total aktivitet ble målt som gjennomsnitt totalt antall trykk på pedalene og gir et mål for hyperaktivitet.

Antall trykk med interresponstid på mindre enn 0,67 sekunder ble brukt som et mål for impulsivitet. Figur 6 viser at SHR-rottene var betydelig mer impulsive enn ADD-, WKY- og SD-rottene når belønningen ble gitt etter bestemte tidsintervaller (sesjon > 12).



Figur 6: Antall trykk med interresponstid på  $< 0,67$  sekunder hos SHR-, ADD-, WKY-, og SD-rotter ( $n=8$ ). Antall trykk med interresponstid på  $< 0,67$  sekunder blir brukt som mål på impulsivitet.

### 1.3.4 PCB og ADHD

Omlag 20% av forekomsten av ADHD kan ha rent miljømessige årsaker mens 80% skyldes gener (Biederman og Faraone 2005). Det kan også tenkes at den genetiske komponenten koder for gener som gjør at man blir ekstra sårbar ovenfor miljøpåvirkninger. Eksponering for ulike kjemiske stoffer og miljøgifter som nikotin, PCB, bromerte flammehemmere, pesticider eller fungicider, under tidlig utvikling er blant annet foreslått å være medvirkende for utvikling av ADHD (Matykiewiczova et al. 2007; Williams og Ross 2007).

Eksponering av normale rotter under utvikling med di-*ortho*-substituerte PCB-kongenerer har blitt vist å gi endret atferd som ligner på atferden som sees hos ADHD-rottemodellen SHR (Holene et al. 1998). Studier av ulykker og

---

arbeidseksponering har vist at PCB også kan forstyrre kognitive funksjoner hos mennesker (Mariussen og Fonnum 2001). Den prenatal utviklingsperioden regnes for å være den mest sårbare perioden for skade på sentralnervesystemet ved PCB-eksponering (Schantz et al. 2003; Chevrier et al. 2008).

Forsøk har vist at en rekke mekanismer for signalstoffer er påvirket av PCB. Dette gjelder plasmamembran- og vesikkelopptak av dopamin, serotonin, glutamat og GABA (Mariussen og Fonnum 2001). Flere *ortho*-klorinerte bifenyler har blitt vist å hemme vesikkelopptak, mens mange ikke-*ortho*-klorinerte bifenyler viste ingen effekt. Det er også observert at eksponering for PCB hemmer dopaminopptak i større grad enn glutamatopptak, og at kloreringsmønsteret avgjør grad av effekten (Mariussen og Fonnum 2001). Det dopaminerge systemet er kjent for å være involvert i ADHD. Dopamin opererer heller ikke i isolasjon i hjernen, men dopamin har sterk påvirkning på andre signalstoffer som acetylkolin (Todd et al. 2003; Livingstone et al. 2009). Det er også sett at ADHD-pasienter som blir behandlet med nikotin får forbedret oppmerksomhet (Kent et al. 2001). PCB fører i tillegg til celledød *in vitro* både for glutamaterge og dopaminerge celler (Mariussen et al. 2002). Eksponering av rotter under utvikling for *ortho*-substituert PCB har derimot visst nedgang i nivået av biogene aminer som dopamin, noradrenalin og serotonin i hjernen (Mariussen og Fonnum 2006).

## 1.4 Hensikt med oppgaven

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke om PCB-eksponering har innvirkning på hjernens biokjemi som kan relateres til lidelsen ADHD. Derfor har vi undersøkt to rottemodeller for ADHD og rotter eksponert for PCB. ADHD karakteriseres av svekket oppmerksomhet og læring, hyperaktivitet og impulsivitet. Parametre som er interessante er aminosyrer (glutamat, aspartat og GABA) som virker som nevrotransmittere og dopamin-, nikotin- og NMDA-reseptorer som er viktig for læring og atferd. Glutamat-reseptorer, og spesielt NMDA-reseptorer, er viktig for

---

prosesser for læring slik som LTP. Stimulering av NMDA-reseptoren ved binding av glutamat eller aspartat er også avhengig av tilstedeværelsen av glysin. Det er velkjent at det dopaminerge systemet er involvert i ADHD. Dopaminerg stimulering er viktig for hjernens belønningssystem, motorisk kontroll, atferd og endokrin kontroll.

Eksposering av PCB har også vist effekter på det dopaminerge systemet. Stimulering av nikotinerge acetylkolinreseptorer resulterer i økt dopaminfrigjøring i striatum (Todd et al. 2003). Tidligere funn viser at ADHD-pasienter som blir behandlet med nikotin får forbedret oppmerksomhet (Kent et al. 2001). Med dette som bakgrunn ble det i denne oppgaven valgt å måle følgende:

- 1) Aminosyrekonsentrasjoner i hjernevev fra rottemodellen for ADHD (SHR), PCB eksponerte rotter og kontrolldyr.
- 2) Nikotinreseptorer i hjernevev fra rottemodeller for ADHD, PCB eksponerte rotter og kontroller.
- 3) Dopaminreseptorer i hjernehalvdeler fra PCB-eksponerte rotter og kontroller.
- 4) NMDA-reseptorer i hjernevev fra rottemodeller for ADHD, PCB eksponerte rotter og kontroller.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Kjemikalier

Kjemikalier	Leverandør
(-)Nikotin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
[ <sup>3</sup> H]epibatidin	PerkinElmer, Boston, USA
[ <sup>3</sup> H]Methylycaconitine	American radiolabel Chemistry Inc, St.Luis, USA
[ <sup>3</sup> H]Maleate (MK-801)	PerkinElmer, Boston, USA
[ <sup>3</sup> H]SCH23390	PerkinElmer, Boston, USA
2-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
BCATM Protein Assay kit	Thermo-Scientific, Rockford, USA
Borsyre	Fluka Chemie, Buchs, Sveits
Filter-Count	PerkinElmer, Boston, USA
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
MK 801-Maleate	Bionuclear Scandinavia, Bromma, Sverige
Perklorsyre 70%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Polyethyleneimine	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland

Serum albumin min 96%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Tris (Trisamine)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
O-phthaldialdehyde	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland

Aminosyrer	Leverandør
L-2- $\alpha$ -Aminoadipinsyre	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
L-Aspartat (Asp)	Pierce, Rockford, USA
L-Glutathion oksidert (GSSH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
L-Glutamat (Glu)	Pierce, Rockford, USA
L-Glutamin (Gln)	Pierce, Rockford, USA
L-Glycin (Gly)	Pierce, Rockford, USA
L-Serin (Ser)	Pierce, Rockford, USA
Gamma-amino-smørsyre (GABA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
L-Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Taurine (Tau)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland

Øvrige kjemikalier ble levert fra standard kommersielle leverandører.

## 2.2 Dyr

Til forsøkene i denne oppgaven ble det brukt rotter av ulike stammer hvor noen ble oppbevart i vår dyrestall. I vår dyrestall ble rottene oppstallet ved  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 5\%$  luftfuktighet, 12/12 timers lys/mørke-syklus med fri tilgang til mat og vann. Standard

gnager-fôr av typen Beekay beddings ble gitt, og rottene kunne spise når de ville og så mye de vil. Som strøtype ble det benyttet Beekay bedding spon fra osp, og Scanbur BK ble benyttet som leverandør. Dyrene ble behandlet i henhold til *Forskrift om forsøksdyr* av 15.januar 1996 for å sikre at dyrene fikk forsvarlig behandling og ikke ble utsatt for unødig smerte og lidelse. Rottene ble bedøvet med CO<sub>2</sub>-gassing og avlivet med dekapitering. Hjernedeler ble dissekert ut på is og frosset på flytende nitrogen. Hjernene ble lagret ved -80°C.

### **2.2.1 Wistar Kyoto avlet ved Harlan (WKY)**

WKY-rotter ble avlet ved Harlan Laboratoriet i Storbritannia og sendt til oss. Hjernene ble brukt til metodeutviklingsforsøk for nikotin-reseptor binding med [<sup>3</sup>H]epibatidin og [<sup>3</sup>H]methyllaconitin radioligand. 4-5 uker gamle rotter fra samme leverandør ble avlivet hos oss. Hos disse rottene ble høyre og venstre hjernehalvdel dissekert ut og benyttet til radioligand måling av nikotin-reseptorer med [<sup>3</sup>H]epibatidin.

For å måle aminosyrekonsentrasjoner ble rotter avlet ved Harlan Laboratoriet i Tyskland, oppstallet i vår dyrestall og avlivet hos oss 5 uker gamle.

PCB eksponerte rotter avlet ved Harlan i Storbritannia, ble eksponert ved Forsvarets Forsvarsinstitutt, Kjeller som beskrevet i avsnitt 2.3. Videre ble rottene sendt til oss fra FFI, hvor de ble avlivet 5 uker gamle. Straks etter avlivning ble striatum og hippocampus dissekert ut. Fra striatum ble det målt aminosyrer og fra hippocampus ble det målt nikotin og NMDA-reseptorbinding med henholdsvis [<sup>3</sup>H]epibatidin og [<sup>3</sup>H]MK801.

### **2.2.2 Wistar Kyoto avlet ved Charles River (ADD)**

WKY-rotter som ble avlet av firmaet Charles River i Tyskland ble internt kalt for ADD-rotter (Sagvolden et al. 2005). Rottene ble oppstallet i vår dyrestall etter

---

ankomst og avlivet 4-5 uker gamle. Høyre og venstre hjernehalvdel ble dissekert ut og benyttet til radioligand måling av nikotin-reseptorer med [ $^3\text{H}$ ]epibatidin.

### **2.2.3 Spontaneously hypertensive Rats (SHR)**

SHR-rotter ble avlet ved firmaet Charles River i Tyskland. Rottene ble avlivet 4-5 uker gamle, høyre og venstre hjernehalvdel ble dissekert ut og benyttet til radioligandmåling av nikotinreseptorer med [ $^3\text{H}$ ]epibatidin. SHR-rotter ble også bestilt fra Harlan i Tyskland. Disse ble avlivet 5 uker gamle og ekstrakter fra helhjernen ble brukt til aminosyremålinger med HPLC.

SHR- rotter avlet hos Harlan i Storbritannia, ble eksponert for PCB ved Forsvarets Forsvarsinstitutt, Kjeller som beskrevet i avsnitt 2.3. Videre ble rottene sendt til oss fra FFI, hvor de ble avlivet 5 uker gamle. Straks etter avlivning ble striatum og hippocampus dissekert ut. Fra striatum ble det målt aminosyrer og fra hippocampus ble det målt nikotin og NMDA-reseptorbinding med henholdsvis [ $^3\text{H}$ ]epibatidin og [ $^3\text{H}$ ]MK801.

### **2.2.4 Sprague Dawley (SD)**

Rottehjerner fra voksne SD-rotter ble sendt til oss på tørris, fra Hanna Mettinen ved avdeling for Environmental health ved Nasjonalt folkehelseinstitutt (KTL) i Kuopio, Finland. Noen rotter var eksponert for maisolje og noen eksponert for PCB 180 i ulike konsentrasjoner. Beskrivelse av eksponering for PCB gis i avsnitt 2.3. Rottene ble oppstallet, eksponert for PCB og hjerner ble dissekert ved KTL. Fra halve hjerner ble det målt aminosyrer med HPLC, nikotinreseptor-binding med [ $^3\text{H}$ ]epibatidin og dopaminreseptorbinding med [ $^3\text{H}$ ]SCH23390.



## 2.3 In vivo PCB-eksponering

WKY- og SHR-rotter ble gitt enten maisolje (kontroll) eller PCB153 (di-orto-kloretert hexaklorobifenyl) løst i maisolje. Dosene ble gitt peroralt ved tre anledninger, da de var 8-11, 14-17 og 19-22 dager gamle. Rottene som ble gitt PCB153, fikk en dose på 3 mg PCB153 per kg kroppsvekt ved hver behandling. Total eksponerings dose for disse rottene var derfor 9 mg PCB per kg. Administrasjonen av PCB153 ble utført av veterinær Per Lausund ved Forsvarets forskningsinstitutt. Rottene ble avlivet og hjernene dissekert ut da de var 35-38 dager gamle.

Sprague Dawley rotter ble gitt enten maisolje (kontroll) eller PCB180 (di-orto-kloretert heptaklorobifenyl) løst i maisolje, i en forsøksperiode som varte i 28 dager.

Eksponeringen foregikk ved Nasjonalt folkehelseinstitutt ved avdeling for Environmental health i Kuopio, Finland. Tabell 2 viser at rottene ble eksponert for 0; 3; 100; 300 og 1000 mg PCB180 per kg kroppsvekt i løpet av 28 testdager. Dosene ble gitt ved tvangsforing peroralt med en kanyle med avrundet spiss. Totaldosene ble delt inn i en startdose (metningsdose) og vedlikeholdsdoser. Metningsdosen ble gitt den første uken og var delt opp i 5 like store underordnede doser. Etter metningsdosen ble det gitt 3 vedlikeholdsdoser per uke i løpet av 3 uker. Dosene ble beregnet med hensyn til oppdatert kroppsvekt ved eksponering.

*Tabell 2: Viser oversikt over SD-rotter eksponert for PCB180. Tabellen viser hvor stor metningsdose rottene fikk og totaldosen per kg kroppsvekt i løpet av 28 dager. Det er i tillegg vist hvor mange dyr som ble brukt fra hver gruppe og kjønn på disse.*

Gruppe	Metningsdose	Total dose			Totalt antall dyr
	mg PCB180/kg/28 dager	mg PCB180/kg/28 dager	Hanner	Hunner	
Kontroll	0	0	5	3	8
PCB180	2,6	3	0	2	2
PCB180	86,4	100	4	0	4
PCB180	259,2	300	2	4	6
PCB180	864,0	1000	4	0	4

## 2.4 Homogenisering og fraksjonering

### 2.4.1 Aminosyre-ekstraksjon

Hjernen ble homogenisert i 7% perklorsyre (PCA) (Johannessen et al. 2001) med 350  $\mu$ M L-2- $\alpha$ -aminoadipinsyre som intern standard, med 8 stryk ved 465 rpm i en glass-teflon homogenisator av merket Schwaben Präzision Nordlingen (type L43). Prøvene ble holdt på is så langt det var mulig. Homogenatet ble sentrifugert på Sorvall sentrifuge ved 20000 g (13000 rpm, Sorvall SS-34 rotor) i 20 min ved 0-4°C slik at proteiner, organeller og membraner sedimenterte (Hassel et al. 1997). Supernatanten med aminosyrer ble overført til et nytt rør og nøytralisert med KOH/HCl til pH 6,5-7,5; siden aminosyrene er mest stabile ved denne pH-verdien. Etter pH-justering ble prøvene sentrifugert ved 20000 g i 20 min ved 0-4°C. Supernatanten ble pipettert av og frosset ved -20°C.

Protein-pelleten fra første sentrifugering ble løst i 0,32 M sukrose, 0,4% SDS og 0,2 M NaOH og senere brukt for å måle proteinmengden som beskrevet i kap 2.5.

### 2.4.2 Tillaging av membranpreparat for radioaktiv ligandbinding

Alt utstyr og buffer-løsninger ble holdt på is under forsøket. Hele og deler av rottehjerner ble homogenisert til 5% homogenat i 0,32 M sukroseløsning som tidligere (avsnitt 2.4.1). 2,5 ml homogenat ble sentrifugert i 30 min ved 100000 g (40000 rpm) og 4°C med Beckman Ultracentrifuge (rotor Ti-80). Pelleten ble så homogenisert i 15 volum 50 mM Tris-HCl buffer ved (pH 7.4). Deretter ble prøvene inkubert ved 25°C i 30 min. Prøvene ble så sentrifugert ved 100000 g og 4 °C i 30 med Beckman Ultracentrifuge (rotor Ti-80).

Protein-pelleten fra andre sentrifugering ble løst i 4 ml 0,32 M sukrose/g hjerne, slik at sluttkonsentrasjonen ble på 0,25 g/ml. Membranpreparatet ble så frosset ved -20°C.

## 2.5 Proteinmåling

Proteinmåling ble utført med Pierce BCA-reagens kit som beskrevet av Smith et al. (1985). Metoden er basert på bruk av bicinchoninic syre (BCA) som kombineres med Biuret-reaksjonen. I alkaliske løsninger vil proteiners peptidbånd redusere  $\text{Cu}^{2+}$  til  $\text{Cu}^{+}$ . To BCA-molekyler vil binde seg til hver  $\text{Cu}^{+}$ , noe som gir et fiolett vannløselig kompleks. Dette fargekomplekset har absorpsjonsmaksimum på 562 nm og kan derfor avleses med et spektrofotometer. Denne kolorimetriske deteksjonen av absorbans er proporsjonal med proteinkonsentrasjon (peptidbindinger) i alkaliske løsninger.

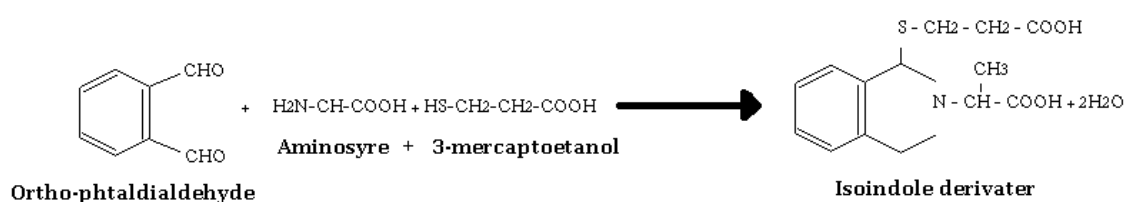
For estimering av de ukjente proteinkonsentrasjonene ble det brukt en standardkurve med bovint serum albumin (BSA) i seks ulike konsentrasjoner (0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1 og 1,5 mg/ml).

Standarder og prøver ble applisert på en 96-brønns mikroplate med 2 paralleller for standarder og 3 paralleller for prøvene. Forsøket ble gjentatt minst 2 ganger. Applikasjonsvolumet var 10  $\mu\text{l}$ , og prøvene ble fortynnet slik at de lå godt innenfor standardkurven (0,5-1,0 mg/ml). Etter applikasjon av prøver og standard ble 200  $\mu\text{l}$  BCA-reagens tilsatt i alle brønnene, og brettet ble inkubert i 30 min ved 37°C i inkubatorskap. Prøvene ble analysert i et spektrofotometer med absorbans på 562 nm. Konsentrasjonen ble omregnet til mg/ml ved å sammenligne med absorbansen til standardprøvene.

## 2.6 Aminosyremålinger

High performance liquid chromatography (HPLC) brukes for å separere ulike aminosyrer i løsninger og måle deres konsentrasjoner. For å kunne detektere aminosyrene må aminosyreekstrakter først derivatiseres med *o*-phtaldialdehyde og 3-mercaptoetanol til isoindole derivater (se Bilde 2.1). Aminosyre ekstraktene kan så sendes gjennom en kolonne med ione-bytter. Aminosyrene fra prøven

kromatograferer med ulik bindingsstyrke, avhengig av ladning. Etter kolonnen ligger en kuvette som all væske passerer før det går i avfallsdunken. Ved kuvetten ligger en fotocelle som detekterer *o*-phtaldehyde (OPA)-aminosyre kompleks. Etter hvert som aminosyrer passerer blir de registrert som kurver i et dataprogram. Hver topp representerer en type aminosyre og arealet under kurven sier hvor mye det er av denne aminosyren. Aminosyrene identifiseres med eksterne aminosyrestandarder. Ved å kjøre eksterne standarder i tillegg til en intern standard som  $\alpha$ -aminoadipinsyre, kan man regne seg fram til de enkelte aminosyrers konsentrasjon.



Bilde 2.1: Teori for OPA derivatisering.

### 2.6.1 Aminosyreanalyse

Aminosyrer fra hjerneekstrakter ble kvantifisert ved HPLC-analyse på Hewlett-Packard 1100 system med fluorescens deteksjon (Shimadzu fluorescens detektor RF-10AXL), etter reaksjon med *o*-phtaldehyde og 2-mercaptoethanol (Hassel et al. 1997; Mengerink et al. 2002). Aminosyrene ble separert på Varian BV ChromSep HPLC SS kolonne (PL Middelburg, Nederland). Kolonnen var 250 mm lang med 4,6 mm diameter. Mobilfasen bestod av 75% 50 mM natriumfosfatbuffer (pH 5,25) og 25% metanol som gikk gradvis over til 25% fosfatbuffer og 75% metanol i løpet av 45 minutter (Hassel et al. 1997; Johannessen et al. 2001). Pumpen hadde en hastighet på 0,4 ml/min og var av typen LC-20AD og av merket Prominence liquid chromatograph. Til prøvene ble det tilsatt  $\alpha$ -aminoadipinsyre (9-350  $\mu\text{M}$ ) som intern standard. Det ble også analysert en blanding av aminosyrene av interesse som ekstern standard.

Relevante topper i HPLC-spekteret ble identifisert og integrert ved bruk av LCsolution 1.21 SP1 software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Mengden av aminosyrer ble kvantifisert fra integralene av arealet under toppene. Resultatene ble tilslutt korrigert for mengde vev samt fortynningsgrad, og uttrykt som nmol/g hjernevekt og nmol/mg protein /ml.

All væske som ble brukt måtte filtreres før bruk for å unngå kontaminasjon av kolonnen. Aminosyreprøvene ble filtrert over til prøveglass før injeksjonen med Naglene 4 mm sprøytefilter via 1 ml sprøyter. Prøvene ble injisert ved hjelp av en SIL-10AF Autosampler med innebygd kjøleelement (3-5°C).

### **2.6.2 Effekten av PCA-proteinfelling på aminosyrekonsentrasjoner og proteinbinding**

Det ble preparert åtte 10 mM aminosyrestandard-prøver som inneholdt 5 aminosyrer (aspartat, glutamat, glutamin, GABA og  $\alpha$ -aminoadipinsyre). Av de 8 prøvene ble fire tilsatt serumalbumin 5 mg/ml og fire ble ikke tilsatt noe. Dette ble gjort for å se om proteinbinding og PCA kunne påvirke aminosyrekonsentrasjonen. De fire standardene som ble tilsatt BSA ble også tilsatt 7% PCA, mens resten ble kun tilsatt vann. Deretter ble alle prøvene sentrifugert ved 20000 g (13000 rpm, Sorvall-SS-34 rotor) i 20 min ved 0-4°C (Hassel et al. 1997). Supernatanten med aminosyrer ble pipettert av og pH-justert til ca pH 7,2 med KOH/HCl. Deretter ble de sentrifugert en gang til ved 20000 g i 20 min ved 0-4°C Supernatanten ble frosset ved -20 °C for senere HPLC-analyse, som beskrevet i avsnitt 2.6.1.

## **2.7 Radioaktiv reseptorbinding**

Radioaktiv ligandbinding er en metode som benyttes for å studere reseptorer. Metning, kinetikk og hemming er oftest de parametrene man kan undersøke ved et slikt forsøk. En radioligand er et radioaktivt merket molekyl som er ligand for et bestemt protein som skal detekteres. Radioliganden inkuberes med sitt målprotein, og

ubundet radioaktivitet vaskes vekk. Bindingen som blir igjen etter skylling vil være spesifikk binding til målproteinet i tillegg til uspesifikk binding. Uspesifikk binding er binding til alt annet enn målproteinet. Dette inkluderer binding til andre proteiner, filteret, adsorpsjon til vev og oppløsning i membranlipider (Bylund og Toews 1993). Den uspesifikke bindingen kan måles ved å tilsette en umerket ligand som binder seg til målproteinet, på lignende vis som radioliganden. Denne liganden tilsettes i stort overskudd slik at det hemmer all binding av radioliganden til målproteinet. Binding som deretter finner sted er uspesifikk. Måling av total og uspesifikk binding gir oss muligheten til å kalkulere oss fram til spesifikk binding (Ligning 2.1). Vi ønsker høyest mulig prosent spesifikk binding (Ligning 2.2).

$$\text{Ligning 2.1} \quad \text{Spesifikk binding} = \text{Total binding} - \text{Uspesifikk binding}$$

$$\text{Ligning 2.2} \quad \% \text{ Spesifikk binding} = \frac{(\text{Total binding} - \text{Uspesifikk binding})}{\text{Total binding}} \times 100$$

### 2.7.1 Måling av D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorbinding

Målingene ble utført etter prinsipper beskrevet av von Euler (1991) og Kontur et al. (1994). Membranpreparatet ble opparbeidet som beskrevet i avsnitt 2.4.2.

Inkubasjonsmediet besto av 124-132 µl inkuberingsbuffer (50 mM tris-HCL, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> og 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4), 50 µl helhjernehomogenat (14 mg/ml), 100 nM ketanserin. Ketanserin ble tilsatt for å blokkere binding til 5-HT<sub>2</sub>-reseptoren siden SCH 23390 også binder seg til denne. For å måle uspesifikk binding ble det tilsatt umerket SCH23390 med en sluttkonsentrasjon på 1 nM. For deteksjon av reseptorer ble det tilsatt radioaktivt merket [<sup>3</sup>H]SCH23390 til alle prøvene med en sluttkonsentrasjon på 1 nM og inkubert i 30 min ved romtemperatur (Ca 25 °C). Forsøket ble utført i duplikat.

---

## Filtrering

Prøvene ble vakuumfiltrert gjennom Whatman glassfiberfilter (type GF/B, 25mm) og skylt 3 ganger med 3 ml iskald inkuberingsbuffer. For å redusere uspesifikk binding til filteret ble de på forhånd bløtlagt i 1% polyetylenimin i 60-120 min. Etter filtrering ble filtrene plassert i plastikkør og tilsatt 4 ml tellvæske (Filter count). Radioaktiv binding ble målt som desintegrasjoner per minutt (DPM1) i en scintillasjonsteller Tri-Carb 3100TR fra Perkin Elmer.

### 2.7.2 Metodeutvikling for måling av nikotin-reseptorer med [<sup>3</sup>H]epibatidin

Til disse metodeforsøkene ble det brukt halve hjerner fra WKY rotter. Tillagingen av membranpreparat ble gjort som beskrevet i avsnitt 2.4.2. Inkubasjonsmediet besto av 400-472 µl inkuberingsbuffer (50 mM Tris-HCl med pH 7,4), 1 nM [<sup>3</sup>H]epibatidin; 0,1 mM (-) nikotin og 0,2-0,36 mg homogenat per ml. Prøvene ble inkubert 1-3 timer og skylt 3 ganger med 3 ml iskald Tris-HCl. For deteksjon av radioaktiv binding ble det brukt filtreringsmetoden som er beskrevet i avsnitt 2.7.1.

## Proteinkonsentrasjon

Det ble testet 12 ulike proteinkonsentrasjoner mellom 0,02 – 1 mg/ml. Prøvene ble inkubert med 1 nM [<sup>3</sup>H]epibatidin i 3 timer og deretter filtrert og skylt 3 ganger med 3 ml iskald Tris-HCl.

## Vaskeprosedyre

Optimal skylling med lavest mulig uspesifikk-binding i forhold til total binding ble undersøkt. Det ble testet 1-8 ganger skylling med 3 ml iskald Tris-HCl. Forsøket ble utført med en proteinkonsentrasjon på 0,2 mg/ml og inkuberingstiden var 1 time.

## Inkuberingstid

Tidligere har prøver med [<sup>3</sup>H]epibatidin blitt inkubert i 3 timer for å være helt sikker på at radioliganden har nådd reaksjonslikevekt. Dette er trolig unødvendig lang tid,

derfor ble det undersøkt 8 ulike inkuberingstider fra 5 min til 3 timer (5 min, 10 min, 30 min, 1 time, 1,5 timer, 2 timer, 2,5 timer og 3 timer). Forsøket ble utført med proteinkonsentrasjon på 0,2 mg/ml, og filteret ble skylt 3 ganger med 3 ml iskald Tris-HCl etter filtrering av prøven.

### **Metningskurve for [<sup>3</sup>H]epibatidin**

Det ble valgt ut 12 konsentrasjoner [<sup>3</sup>H]epibatidin mellom 0,001–20 nM hvor det ble målt reseptorbinding. Det ble benyttet en proteinkonsentrasjon på 0,2 mg/ml og inkuberingstiden var 1 time.

#### **2.7.3 Nikotinreseptor-binding med [<sup>3</sup>H]epibatidin**

Membranpreparat fra hjernevev ble opparbeidet som beskrevet i avsnitt 2.4.2. Inkubasjonsmediet besto av 415-472 µl inkuberingsbuffer (50 mM tris-HCl); 0,1-1 nM [<sup>3</sup>H]epibatidin og 0,2 mg membranhomogenat per ml. For å måle lavaffinitets bindingssete av nikotin-reseptorer ble det brukt [<sup>3</sup>H]epibatidin i en konsentrasjon på 1 nM. For å måle høyaffinitets bindingsete på nikotinreseptorer ble det brukt [<sup>3</sup>H]epibatidin i en konsentrasjon på 0,1 nM. Uspesifikk binding ble målt ved tilsetning av 0,1 mM (-)nikotin. Prøvene ble inkubert i 1 time og filteringen foregikk som beskrevet i avsnitt 2.7.1. Forsøkene ble utført med duplikater.

#### **2.7.4 NMDA-reseptorbinding med [<sup>3</sup>H]MK801**

Membranpreparat fra hjernevev ble opparbeidet som beskrevet i avsnitt 2.4.2. Inkubasjonsmediet besto av 220-270 µl inkuberingsbuffer (Tris Hepes pH 7,4: 4,5 mM Tris og 5,0 mM Hepes); 0,01 mM glysin; 0,01 mM glutamat og ca 0,25 mg membranhomogenat per ml. For måling av uspesifikk binding ble det tilsatt 0,1 mM umerket MK801. Glysin og glutamat binder seg til NMDA-reseptorer og fører til åpning av ionekanalen. Dette var nødvendig siden bindingssetet til antagonist MK801 ligger skjult inni denne ionekanalen. Det ble brukt en sluttkonsentrasjon av



---

[<sup>3</sup>H]MK801 på 4 nM. Filteringen foregikk som beskrevet i avsnitt 2.7.1. Forsøket ble utført med duplikater.

### **2.7.5 Metodeutvikling for måling av nikotinreseptorer med [<sup>3</sup>H]methylllycaconitin**

[<sup>3</sup>H]methylllycaconitin er en nikotinreseptor-antagonist som binder seg spesifikt til  $\alpha 7$  nikotinreseptor-subenheten. Til disse metodeforsøkene ble det brukt halve hjerner fra WKY rotter. Tillagingen av membranpreparat ble gjort som beskrevet i avsnitt 2.4.2.

Som buffer ble det brukt fosfat-buffer (PBS) med pH 7,4. Som radioligand ble det benyttet 1 nM [<sup>3</sup>H]methylllycaconitin, og for å måle uspesifikk binding ble det benyttet 1 mM (-) nikotin. Filtreringsmetoden beskrevet i avsnitt 2.7.1 ble brukt.

### **Proteinkonsentrasjon**

Proteinkonsentrasjonen i prøveglasset har mye å si for hvor høye telletall (DPM1) man oppnår ved tilsetning av radioligand. Dersom telletallet er lavt i forhold til proteinkonsentrasjon, betyr dette at radioligandens bindingssete finnes i lav konsentrasjon i vevet. Det kan derfor være nødvendig å øke proteinkonsentrasjonen for å få tilstrekkelig høy binding (DPM1).

Det ble testet 5 ulike proteinkonsentrasjoner mellom 1-5 mg/ml. Prøvene ble inkubert med 1 nM [<sup>3</sup>H]methylllycaconitin i 2,5 timer og deretter filtrert. Filteret ble skylt 3 ganger med 2 ml iskald PBS-buffer.

### **Vaskeprosedyre**

Dette forsøket ble gjort for å undersøke hvilken vaskeprosedyre som var optimal for å oppnå høyest mulig spesifikk binding i forhold til uspesifikk binding.

Det ble testet 1, 2, 3 og 4 ganger skylling med 2 ml PBS-buffer. Forsøket ble utført med en proteinkonsentrasjon på 3 mg/ml. Prøvene ble inkubert med 1 nM [<sup>3</sup>H]methylllycaconitin i 1 time og deretter filtrert.

---

## Inkuberingstid

Ved tidligere forsøk med [ $^3\text{H}$ ]methylllycaconitine har membranpreparatet blitt inkubert i 3,5 timer, for å være helt sikker på at bindingen av radioliganden hadde nådd reaksjonslikevekt.

Det ble undersøkt 4 ulike inkuberingstider på henholdsvis 30 minutter, 1 time, 2 timer og 3 timer. Forsøket ble utført med en proteinkonsentrasjon på 2 mg/ml. Prøvene ble inkubert med 1 nM [ $^3\text{H}$ ]methylllycaconitin i 1 time og deretter filtrert. Filteret ble skyllet 3 ganger med 2 ml iskald PBS-buffer.

## Metningskurve for [ $^3\text{H}$ ]methylllycaconitin

Det ble valgt ut 4 konsentrasjoner [ $^3\text{H}$ ]methylllycaconitin på henholdsvis 0,5; 1; 2 og 5 nM hvor det ble målt reseptorbinding. Forsøket ble utført med en proteinkonsentrasjon på 1 mg/ml. Prøvene ble inkubert med [ $^3\text{H}$ ]methylllycaconitin i 2,5 timer og deretter filtrert. Filteret ble skylt 3 ganger med 2 ml iskald PBS-buffer.

## Inkuberingstemperatur

Det var ønskelig å undersøke om inkuberingstemperatur hadde noen innvirkning på binding av [ $^3\text{H}$ ]methylllycaconitin til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subbenheten.

Forsøket ble utført med en proteinkonsentrasjon på 3 mg/ml. Noen av prøvene ble inkubert med 1 nM [ $^3\text{H}$ ]methylllycaconitin i 1 time i romtemperatur mens resten ble inkubert på is. Ved filtrering ble filteret skyllet 3 ganger med 2 ml iskald PBS-buffer.

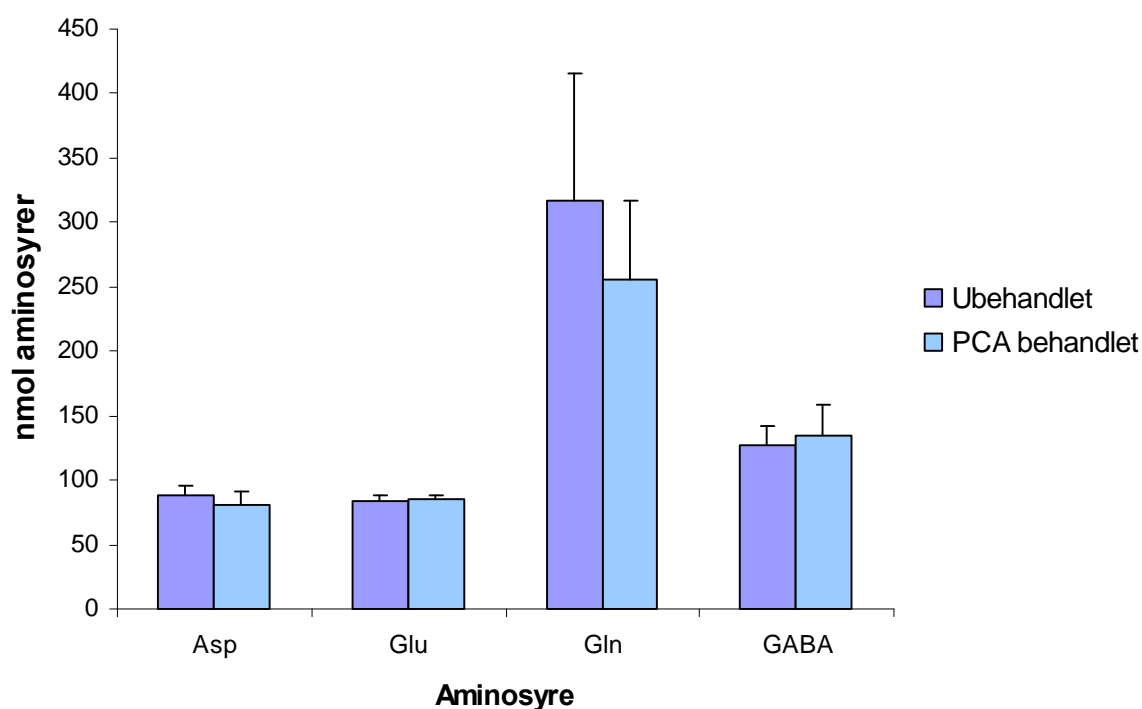
### 3. Resultat

#### 3.1 Metodeutvikling

##### 3.1.1 Proteinbinding og effekten av PCA-proteinfelling på aminosyrekonsentrasjoner

Det var ønskelig å teste om proteinbinding eller PCA felling er med på endre konsentrasjonen av aminosyrer. Aminosyrestandarer ble laget som beskrevet i avsnitt 2.6.2 og analyse av prøvene ble gjort som beskrevet i avsnitt 2.6.1.

Figur 7 viser målingene gjort av aminosyrer fra standarder som ble tilsatt protein og PCA felling sammenlignet med ubehandlede standarder. Resultatene viser ingen forskjell i aminosyrekonsentrasjon mellom protein og PCA behandlede standarder og ubehandlede standarder (kontroll).



*Figur 7: Målinger av standard aminosyreløsning behandlet og ubehandlet med PCA. Stolpene viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM utført med 5 paralleller. Figuren viser aminosyrene aspartat (asp), glutamat (Glu), glutamin (gln) og gamma-aminosmørsyre (GABA).*

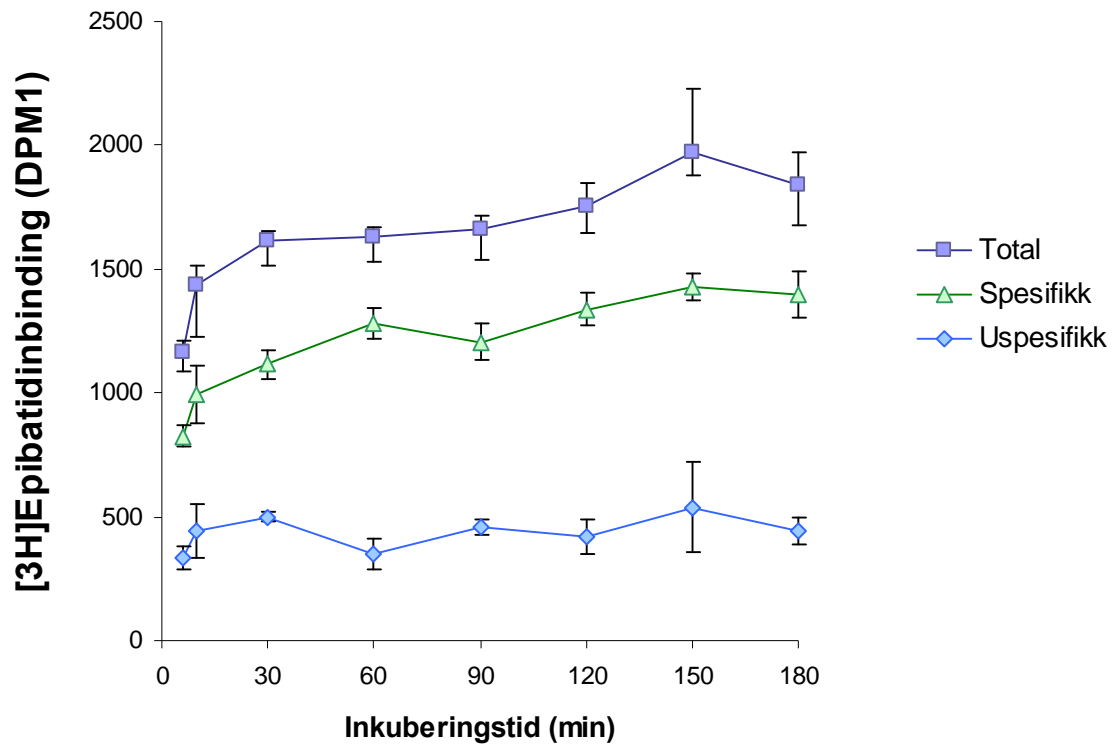
### 3.1.2 Innledende metodeforsøk for måling av $\alpha_4/\beta_2$ nikotinreseptor-subenhet

Epibatidin er en nikotinreseptor-agonist som binder seg spesifikt til  $\alpha_4/\beta_2$  nikotinreseptor-subenheter. Bindingen til andre subenheter er lav i forhold til  $\alpha_4/\beta_2$  subenhetene slik at det hovedsakelig er denne bindingen som blir registrert (Lee et al. 2001). Ved å bruke [ $^3$ H]epibatidin som kan detekteres, er det mulig å måle nivået av  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhetene. Metodeforsøk ble gjort for å optimalisere forholdene for reseptor binding med [ $^3$ H]epibatidin. Ved radioligandforsøk er det optimalt å oppnå høyest mulig spesifikk binding i forhold til uspesifikk binding. Forholdet mellom spesifikk og uspesifikk binding avhenger først og fremst av hvor spesifikk radioliganden er, men også forsøksparametre som vevsmengde, radioligandkonsentrasjon, inkuberingstid og antall skyllinger. Det var derfor ønskelig å undersøke reseptorbinding ved å variere disse parametrene. Membranpreparatet for metodeforsøk ble opparbeidet som beskrevet i avsnitt 2.4.2. Metodeforsøkene er beskrevet i avsnitt 2.7.5.

#### Inkuberingstid

Inkubering med forskjellig lengde ble gjort for å undersøke hvordan [ $^3$ H]epibatidin binding til  $\alpha_4/\beta_2$  nikotinreseptor-subenhetene endrer seg ved ulike inkuberingstider. Det var ønskelig å finne de mest optimale betingelsene.

Figur 8 viser forholdet mellom inkuberingstid (min) og total og uspesifikk binding (DPM1). Den uspesifikke bindingen holdt seg meget konstant ved inkuberingstid mellom 10 til 180 min. Den totale bindingen økte svakt ved inkuberingstid mellom 30 til 180 min. Stigningskurven var størst for spesifikk binding fra 0 til 30 min. For senere forsøk ble det valgt en inkuberingstid på 60 minutter.



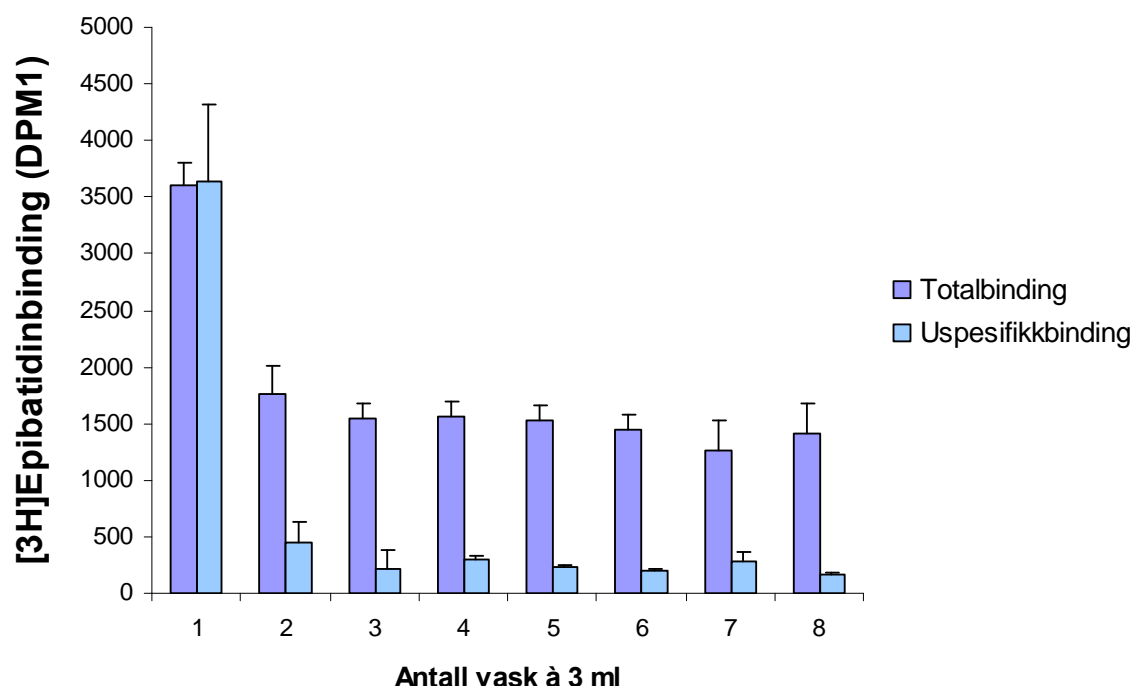
Figur 8: [ $^3\text{H}$ ]epibatidinbinding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhet. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre forsøk utført i duplikat.

## Vaskeprosedyre

Forskjellige antall skyllinger av filter, ble gjort etter filtrering av prøvene. Det ble gjort for å undersøke hvordan [ $^3\text{H}$ ]epibatidinbinding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhetene endrer seg ved ulike vaskeprosedyrer. Ulike skyllevolum har tidligere blitt testet ut på vårt laboratorium og viste seg å ha liten effekt på total og uspesifikk binding, det var derfor av stor interesse å teste ulikt antall skyllinger. Det ble derfor valgt å teste 1-8 ganger skylling med 3 ml iskald Tris-HCl buffer.

Figur 9 viser [ $^3\text{H}$ ]Epibatidinbinding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhet etter økende antall skyllinger av filter og forholdet mellom total- og uspesifikk-binding. Det så ut til at én vask (à 3 ml) ga like stor uspesifikk binding som total binding. Ved to til åtte vask var det en tydelig nedgang i uspesifikk binding i forhold til total binding. Total

binding holdt seg ganske konstant ved to til åtte skyllinger. Det ble derfor valgt å fortsette med å skylle tre ganger 3 ml.



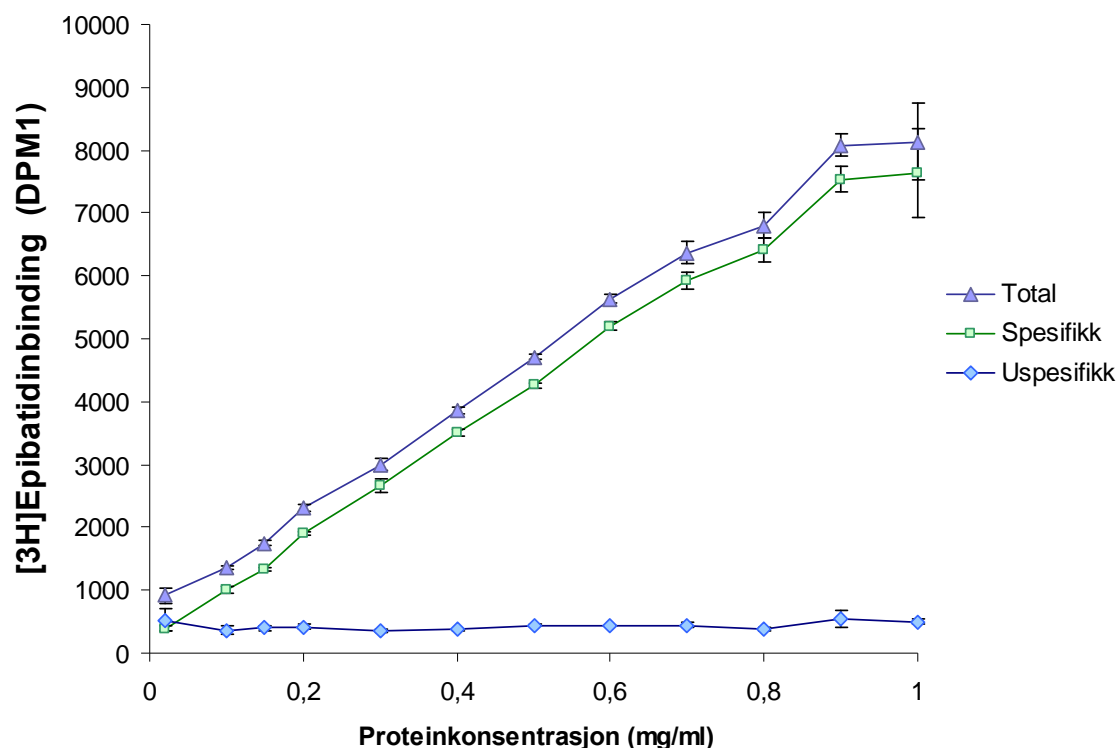
Figur 9: [ $^3\text{H}$ ]Epibatidinbinding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhet etter økende antall skyllinger av filter. Hvert punkt viser gjennomsnitt binding  $\pm$  SEM av tre forsøk utført i duplikat.

## Proteinkonsentrasjoner

Tilsetning av ulike mengder membranpreparat ble gjort for å undersøke hvordan [ $^3\text{H}$ ]epibatidinbinding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhetene endrer seg ved ulike proteinkonsentrasjoner. Det ble valgt å teste ut 12 proteinkonsentrasjoner fra 0,02 til 1 mg/ml.

Figur 10 viser forholdet mellom vevsmengde (mg vev/ml) og total, spesifikk og uspesifikk binding (DPM1). Resultatene viser at spesifikk binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhetene økte proporsjonalt med konsentrasjon av protein i prøveglasset. Uspesifikk binding bestod hovedsakelig av filterbinding og holdt seg konstant ved økt vevsmengde (proteinmengde). Total binding økte proporsjonalt med økende proteinkonsentrasjon. For måling av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binding til  $\alpha_4/\beta_2$  -

nikotinreseptor-subenheter ble det valgt å bruke en proteinkonsentrasjon på 0,25 mg/ml.



Figur 10: [ $^3\text{H}$ ]Epibatidin binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhetene ved økende proteinkonsentrasjoner. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre forsøk utført i duplikat.

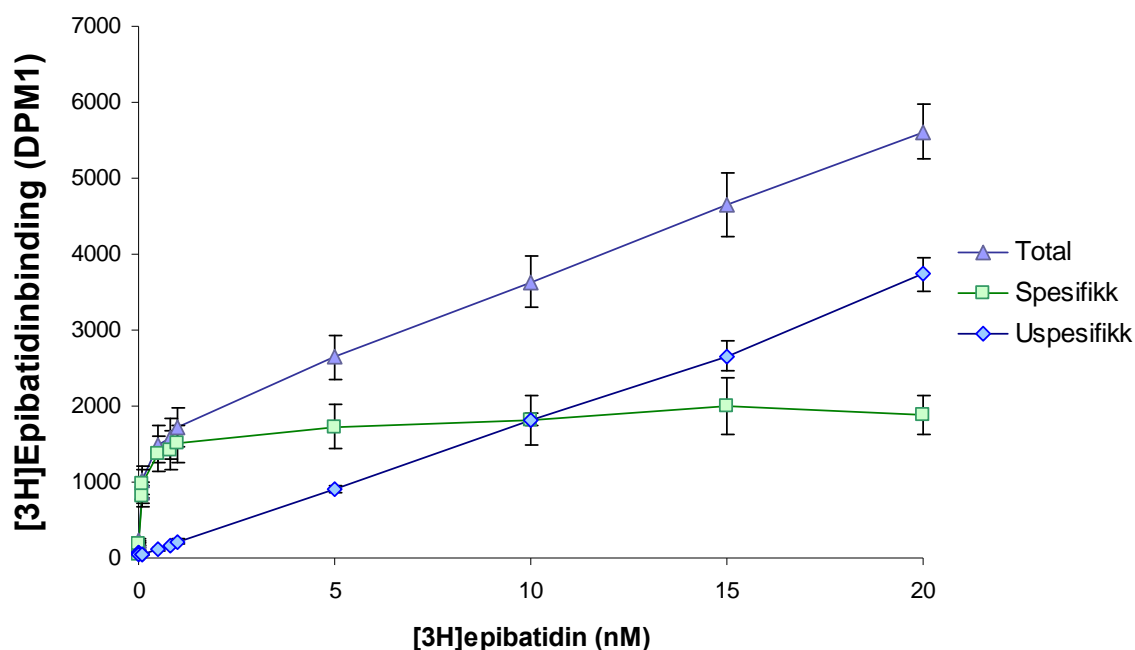
### [ $^3\text{H}$ ]Epibatidin metningskurve

Undersøkelse av [ $^3\text{H}$ ]Epibatidin metningskurve ble gjort for å undersøke hvordan den spesifikke bindingen (DPM1) til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhetene endret seg ved ulike [ $^3\text{H}$ ]epibatidin-konsentrasjoner (nM). Det ble derfor valgt å teste ut 12 ulike [ $^3\text{H}$ ]epibatidin konsentrasjoner fra 0,001 til 20 nM.

Figur 11 viser forholdet mellom spesifikk binding (DPM1) og konsentrasjonen av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin. Resultatet viser at spesifikk binding til nikotinreseptor-subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  økte raskt ved lave (0-1 nM) konsentrasjoner men flatet ut etter 1 nM. At den spesifikke bindingen lar seg mette er en god indikasjon på at metoden fungerer. Men

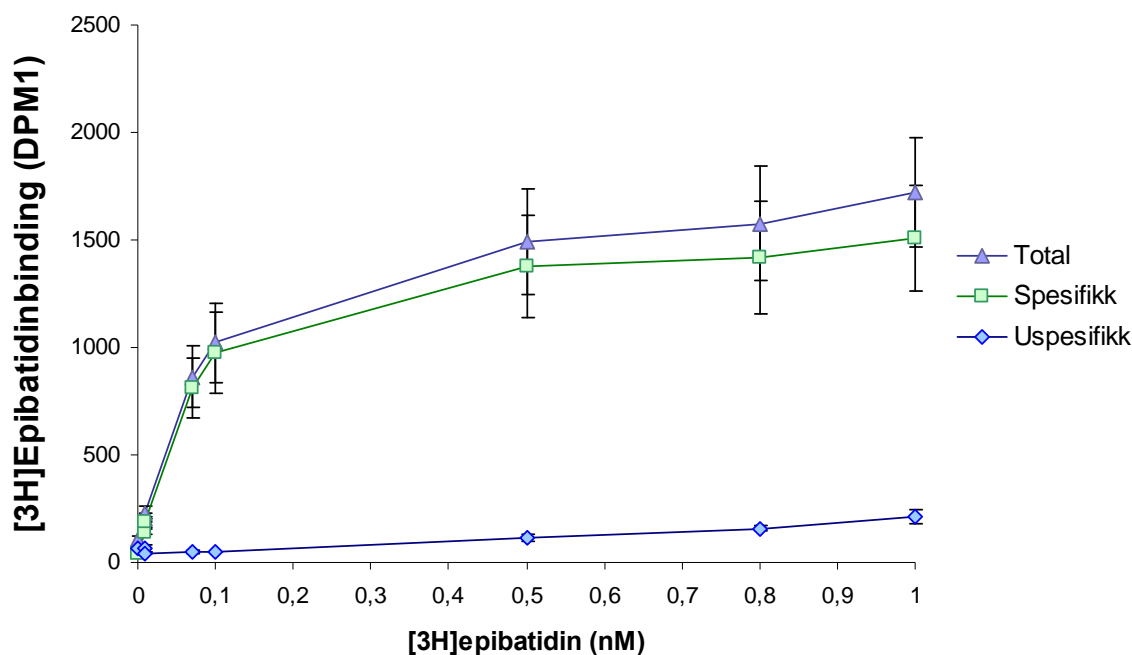
den uspesifikke bindingen fortsatte å øke lineært sammen med [ $^3\text{H}$ ]epibatidin konsentrasjonen.

Figur 12 viser samme graf som Figur 11, forskjellen er at denne figuren bare viser målingene fra laveste konsentrasjoner av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin, fra 0,001 nM til 1 nM. Resultatet viser at spesifikk binding til nikotinreseptor-subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  øker raskt i starten men flater ut etter 0,1 nM. Ved [ $^3\text{H}$ ]epibatidin konsentrasjon på 0,8 nM og høyere begynner den totale bindingen å øke hurtigere enn den uspesifikke bindingen, og vi ser en oppgang i den spesifikke nikotinreseptor-bindingen. Denne utflatningen ved 0,1 nM synes ikke i Figur 11 siden disse verdiene er for lave. Siden [ $^3\text{H}$ ]epibatidin bindingen flater ut to ganger indikerer dette på at [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binder seg til to ulike bindingsseter. Det ene bindingssetet må derfor ha høy affinitet for [ $^3\text{H}$ ]epibatidin og er mettet ved en konsentrasjon på 0,1 nM og det andre inkluderer både lav og høy-affinitetsbindingsetet og blir mettet ved en konsentrasjon på 1 nM.



Figur 11: Binding av  $\alpha_4/\beta_2$  nikotinreseptor-subenhetene ved [ $^3\text{H}$ ]epibatidin-konsentrasjoner på 0,001-20 nM. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire forsøk utført i duplikat.





Figur 12: Binding av  $\alpha_4/\beta_2$  nikotinreseptor-subenhetene ved [ $^3\text{H}$ ]epibatidine-konsentrasjoner på 0,001-1 nM. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire forsøk utført i duplikat.

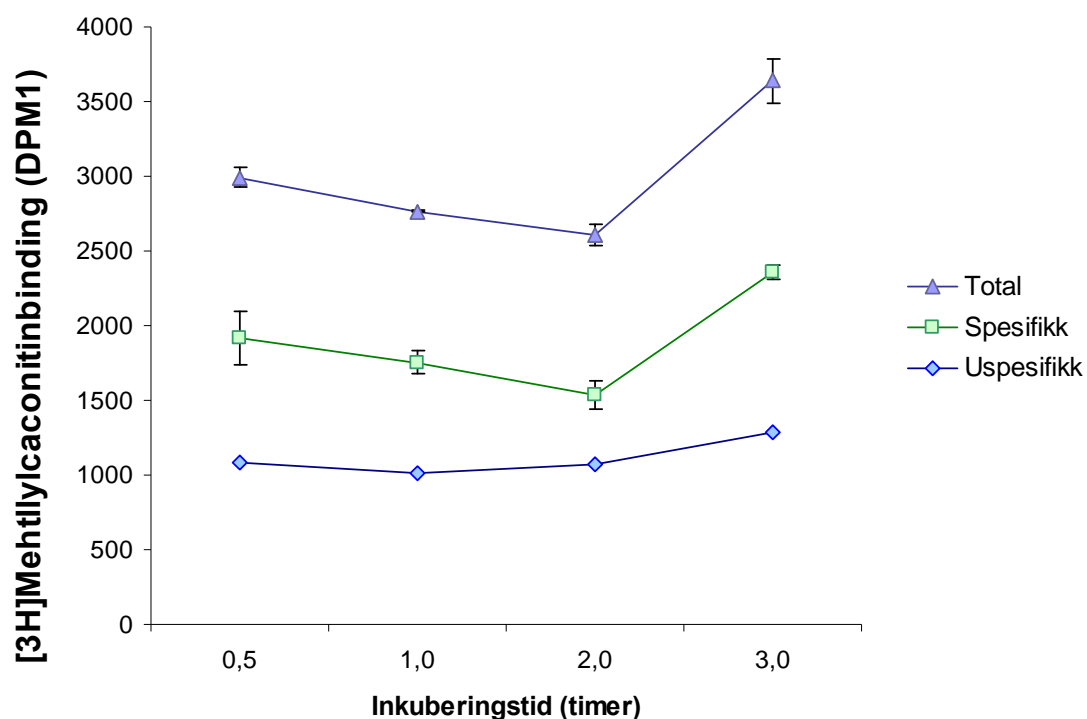
### 3.1.3 Innledende metodeforsøk for måling av $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subenhet

Methyllycaconitin er en nikotinreseptor-antagonist som binder seg helt spesifikt til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subenheten. Ved å merke methyllycaconitin med tritium får vi [ $^3\text{H}$ ]methyllycaconitin som kan detekteres, og på denne måten er det mulig å måle nivået av  $\alpha_7$  nikotinreseptor-subenheten. Metodeforsøk ble gjort for å optimalisere forholdene for reseptor måling med [ $^3\text{H}$ ]methyllycaconitin. Det som er mest optimalt for radioligandforsøk er høyest mulig spesifikk binding i forhold til uspesifikk binding. Forholdet mellom spesifikk og uspesifikk binding avhenger først og fremst av hvor spesifikk radioliganden er, men også forsøksparametre som vevsmengde, radioligandkonsentrasjon, inkuberingstid, inkuberings temperatur og antall skyllinger av filter. Det var derfor ønskelig å undersøke binding ved å variere disse parametrene. Membranpreparatet til disse metodeforsøkene ble opparbeidet som i avsnitt 2.4.2 fra hjernehomogenat fra WKY-rotter. Metoden for metodeforsøket er beskrevet i avsnitt 2.7.5.

## Inkuberingstid

Inkubering med forskjellig lengde ble gjort for å undersøke hvordan  $[^3\text{H}]$ methyllycaconitin binding til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subbenheten endrer seg ved ulike inkuberingstider. Det var ønskelig å finne kortest mulig inkuberingstid med god optimal binding for å spare tid.

Figur 13 viser forholdet mellom inkuberingstid (min) og total og uspesifikk binding (DPM1). Den totale bindingen var tilnærmet konstant etter inkuberingstid på 0,5-2 timer, og høyest total binding ble målt etter 3 timer. Den uspesifikke bindingen holdt seg tilnærmet konstant ved inkuberingstid mellom 0,5 til 2 timer og var litt høyere ved inkuberingstid på 3 timer. Den høyeste spesifikke bindingen var etter 3 timers inkuberingstid. Det ble ut i fra dette valgt en inkuberingstid på 2,5 timer.

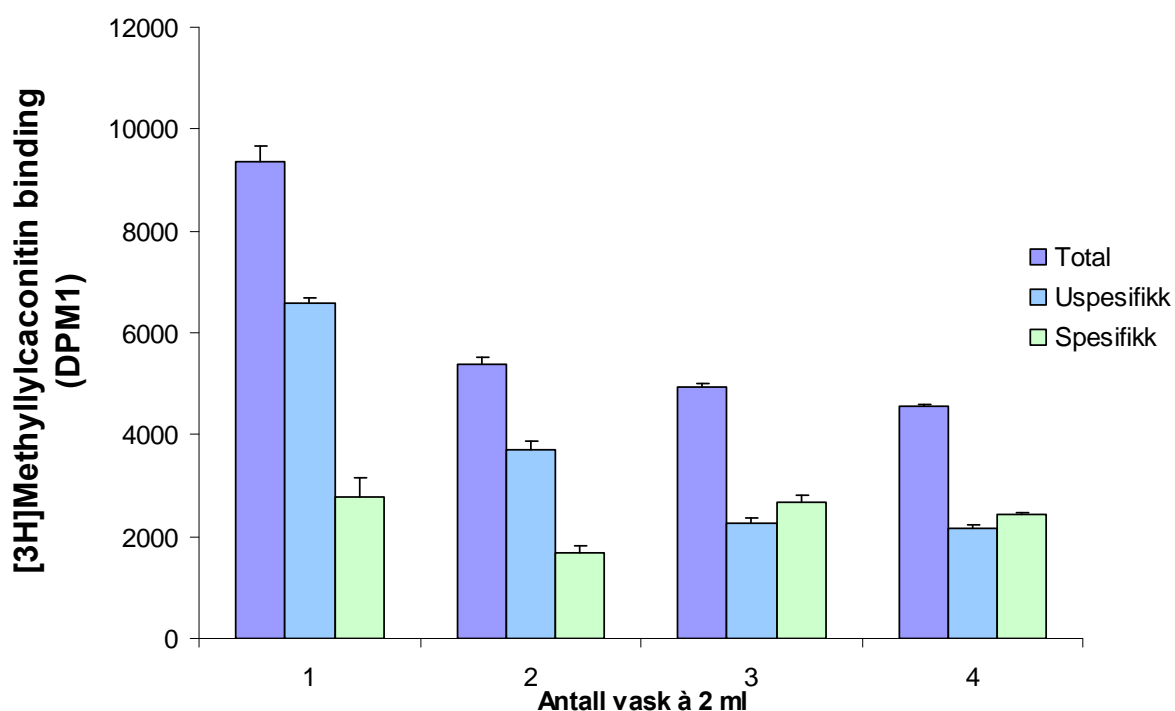


Figur 13:  $[^3\text{H}]$ Methyllylcocanitin-binding til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subenhet. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av duplikater.

## Vaskeprosedyre

Forskjellige antall skyllinger av filter ble gjort for å undersøke hvordan [ $^3\text{H}$ ]methylllylcaconitinbinding til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subbenheten endrer seg ved ulike vaskeprosedyrer. Ulike skyllevolum har tidligere blitt testet ut på vårt laboratorium og så ut til å ha liten effekt på total og uspesifikk binding. Det var av stor interesse å teste ulikt antall skyllinger av filter etter filtrering av homogenatet. Det ble derfor valgt å teste 1; 2; 3 og 4 ganger skylling med 2 ml iskald PBS-buffer.

Figur 14 viser forholdet mellom antall vask (å 2 ml) og total og uspesifikk binding (DPM1). Den uspesifikke bindingen ble betydelig redusert etter 3 eller flere skyllinger, mens den spesifikke holdt seg konstant. Vi valgte derfor 3 vask som standard prosedyre.



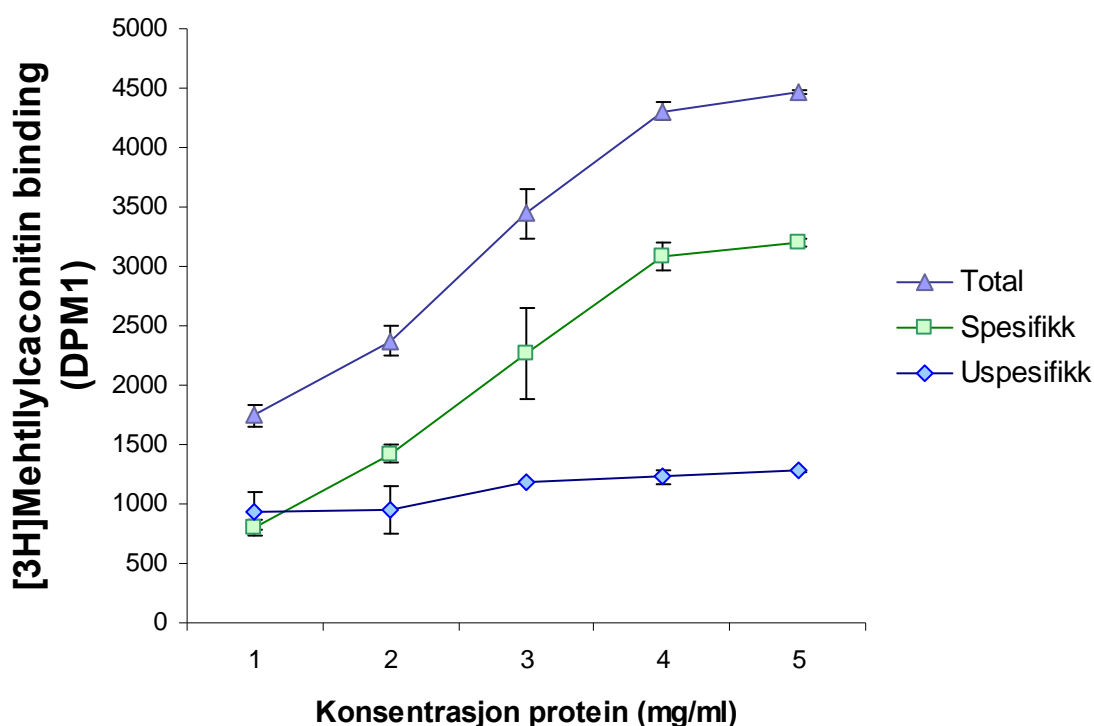
Figur 14: [ $^3\text{H}$ ]Methyllylcaconitin-binding til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subenhet etter økende antall skyllinger av filter. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av triplikater.

## Proteinkonsentrasjoner

Tilsetning av ulike mengder av membranpreparat ble gjort for å undersøke hvordan  $[^3\text{H}]$ methyllycaconitine binding til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subbenheten endret seg ved ulike proteinkonsentrasjoner. Det mest ønskelige var å finne en proteinkonsentrasjon hvor den spesifikke bindingen var optimal. Det ble derfor valgt å teste ut proteinkonsentrasjoner på 1; 2; 3; 4 og 5 mg/ml.

Figur 15 viser forholdet mellom vevsmengde (mg/ml) og total, spesifikk og uspesifikk binding (DPM1). Resultatene viser at spesifikk binding til nikotinreseptor-subenhetene øker proporsjonalt med konsentrasjon av protein i prøveglasset fra 1 til 4 mg protein per ml, og flater ut mellom av 4 og 5 mg protein per ml.

Uspesifikkbinding holdt seg stabil ved økende proteinkonsentrasjon. Noe som skyldes binding til filteret. Total binding økte proporsjonalt med økende proteinkonsentrasjon men flatet ut etter tilsetning av 4 mg protein per ml. For måling av  $[^3\text{H}]$ methyllycaconitin binding til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subbenheten ble det valgt å fortsette med ca 3 mg/ml.

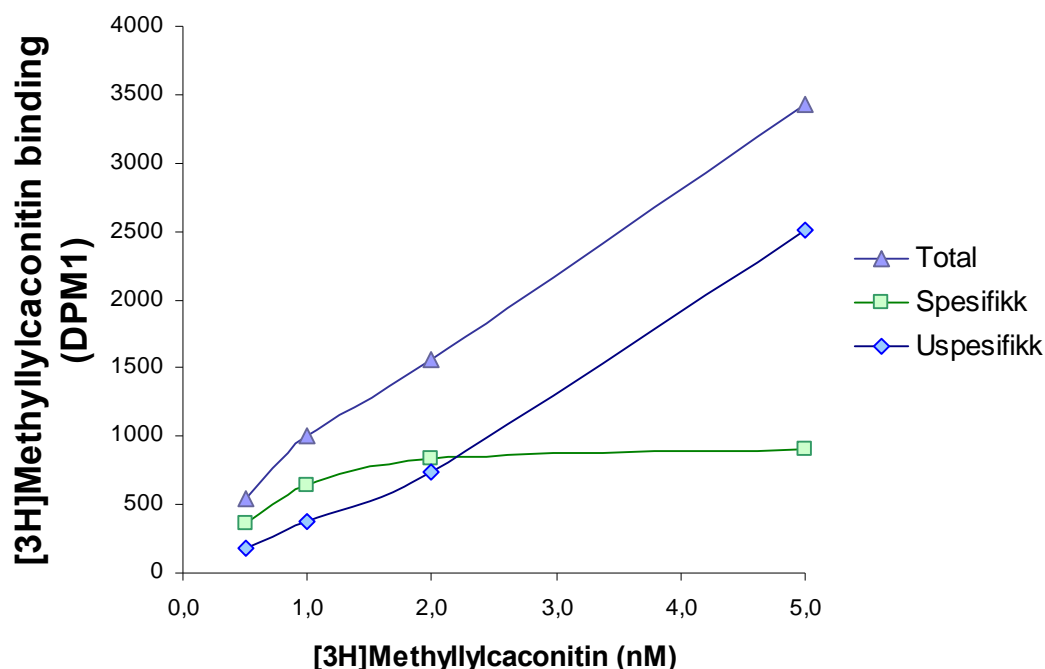


Figur 15: [ $^3\text{H}$ ]Methyllylcaconitin-binding til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subbenhet ved økende proteinkonsentrasjoner. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av duplikater.

### [ $^3\text{H}$ ]Methyllylcaconitine metningskurve

Dette ble gjort for å undersøke hvordan den spesifikke bindingen (DPM1) til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subbenhetene endrer seg ved ulike [ $^3\text{H}$ ]methyllylcaconitin konsentrasjoner (nM). Det ble derfor valgt å teste ut 4 [ $^3\text{H}$ ]methyllylcaconitin konsentrasjoner på 0,5; 1; 2 og 5 nM.

Figur 16 viser forholdet mellom Spesifikk binding (DPM1) og konsentrasjonen av [ $^3\text{H}$ ]methyllylcaconitin. Resultatet viser at spesifikk binding til nikotinreseptor-subbenhetene  $\alpha_7$  øker raskt ved lave konsentrasjoner men flater ut etter 1 nM. Dette skyldes at total binding økte raskere enn uspesifikk binding ved økende tilsetning av [ $^3\text{H}$ ]methyllylcaconotin fram til 1 nM, men ved konsentrasjoner over 1 nM steg total og uspesifikk binding tilnærmet parallelt. At total og uspesifikk binding økte parallelt kan ses ved at linjen for spesifikk binding flater ut. At den spesifikke bindingen lar seg mette er en god indikasjon på at metoden fungerer.

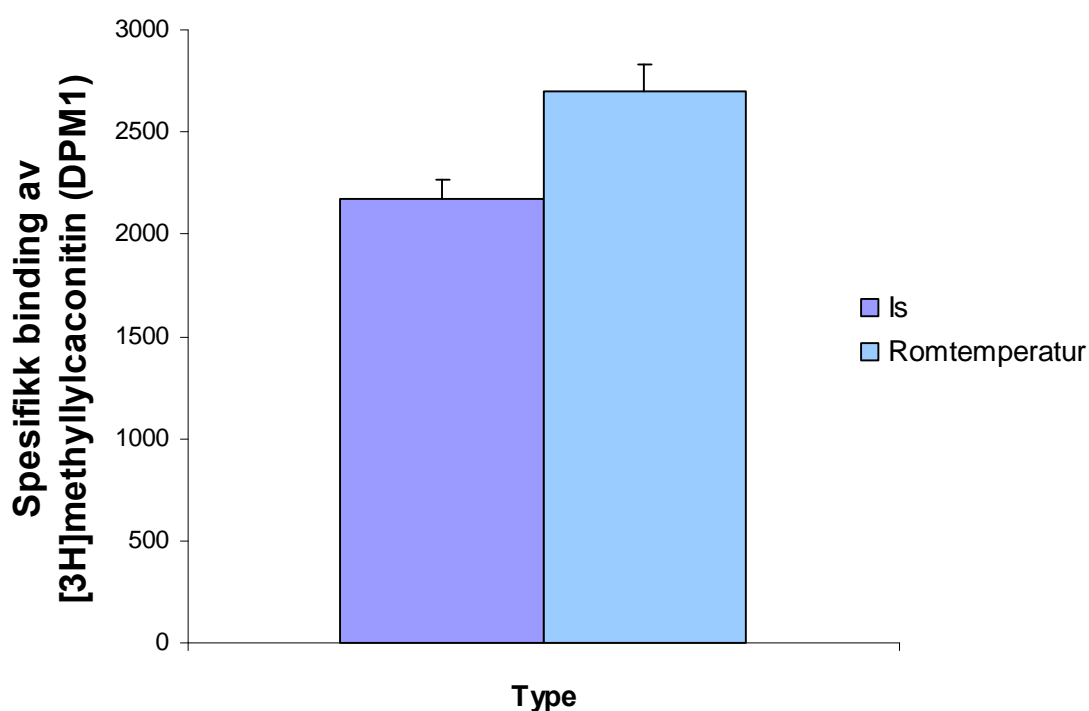


Figur 16: Binding av  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subbenhetene ved [ $^3\text{H}$ ]methyllylcaconitin konsentrasjoner på 0,5-5 nM. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av triplikat.

## Inkuberingstemperatur

Det var ønskelig å undersøke om inkuberingstemperatur hadde noen innvirkning på binding av [ $^3\text{H}$ ]methylllycaconitin til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subenheten. Det ble derfor målt spesifikk radioligandbinding av prøver inkubert på is og ved romtemperatur på ca 25 °C.

Figur 17 viser sammenligning av [ $^3\text{H}$ ]methylllycaconitin binding til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subenheten ved inkubering i romtemperatur og på is. Prøvene som ble inkubert på is viste 19% lavere spesifikk binding enn prøvene inkubert ved romtemperatur. Siden vi fikk høyere spesifikk binding ved inkubering ved romtemperatur ble det valgt å fortsette med dette.



Figur 17: viser sammenligning av [ $^3\text{H}$ ]methylllycaconitin-binding til  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-subenheten ved inkubering i romtemperatur og på is.

---

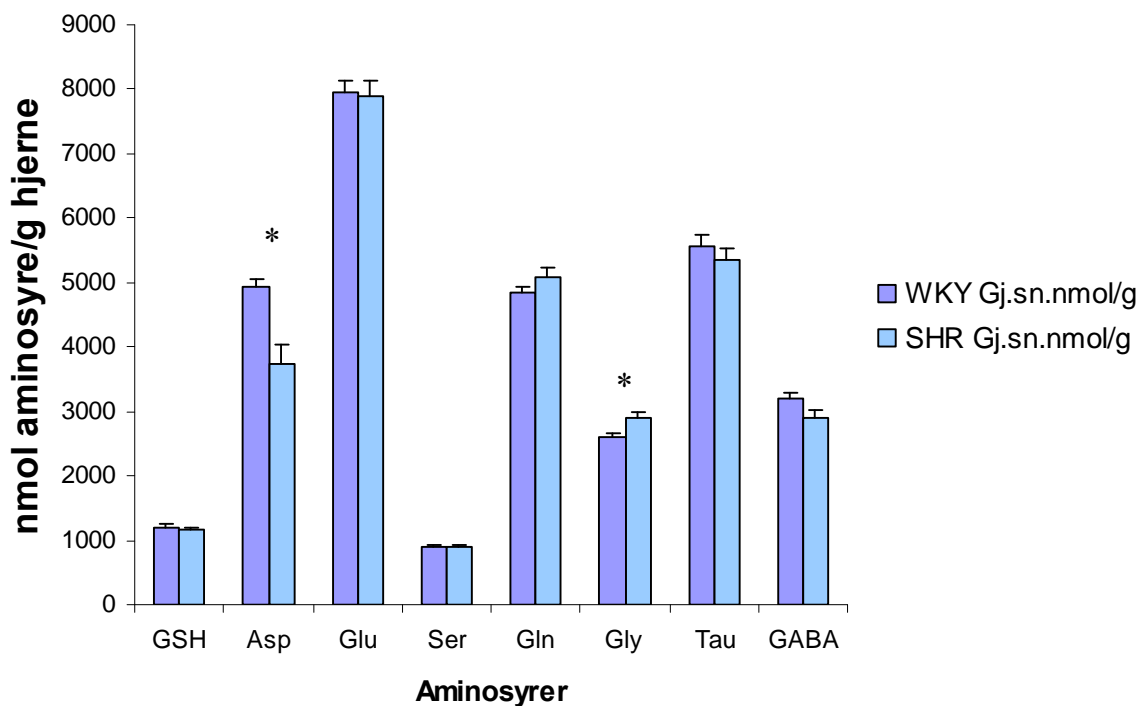
## 3.2 Aminosyrer og reseptorer i hjerner av ADHD rottemodeller og kontroller

Det ble valgt å måle aminosyrekonsentrasjon,  $\alpha_4/\beta_2$  nikotinreseptor-binding og NMDA-reseptorbinding på membranhomogenat laget fra hjerner av rottemodellene WKY, ADD og SHR. Av membranhomogenat fra hjernehalvdeler og hippocampus ble det målt  $\alpha_4/\beta_2$  nikotinreseptor-binding. NMDA-reseptorbinding ble kun målt på membranhomogenat fra hippocampus mens aminosyrer ble målt på hele hjerner i tillegg til striatum.

### 3.2.1 Måling av aminosyrekonsentrasjoner

Det var av interesse å undersøke om ulikheter i aminosyrekonsentrasjoner i hjernen kunne være en medvirkende årsak til forskjell i atferd mellom SHR og WKY. Aminosyreprøver ble opparbeidet fra hele hjerner og striatum fra 5 uker gamle rotter, som i beskrevet i avsnitt 2.4.1. Deteksjon av aminosyrene ble utført som i avsnitt 2.6.1.

Figur 18 viser sammenligning av aminosyrekonsentrasjon fra hele hjerner mellom 5 uker gamle WKY og SHR rotter. Resultatet viser en nedgang i aspartat konsentrasjonen på 24 % ( $p = 0,013$ ) og en liten oppgang i glysin konsentrasjonen på 12% ( $p = 0,033$ ) hos SHR dyrene i forhold til WKY.



Figur 18: Sammenligning av aminosyrekonsentrasjon fra hele hjerner mellom 5 uker gamle Wky og SHR rotter. Resultatet viser signifikant lavere Asp og høyere Gly-konsentrasjoner hos SHR i forhold til WKY. Verdiene er oppgitt i gjennomsnitt aminosyre  $\pm$  SEM av 4-5 paralleller.

Tabell 3: Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor  $*p < 0,05$  viser signifikans. Aminosyrene som ble målt var glutatation (GSH), aspartat (Asp), glutamat (Glu), serien (Ser), glutamin (Gln), glysin (Gly), taurine (Tau), gamma-amino-smørsyre (GABA).

Aminosyrer fra SHR rotte hjerner sammenlignet med Wky		
Aminosyre	p-verdi	Prosent forskjell
GSH	0,687	2
Asp	0,013*	24*
Glu	0,869	1
Ser	0,809	1
Gln	0,218	5
Gly	0,033*	12*
Tau	0,412	4
GABA	0,159	9



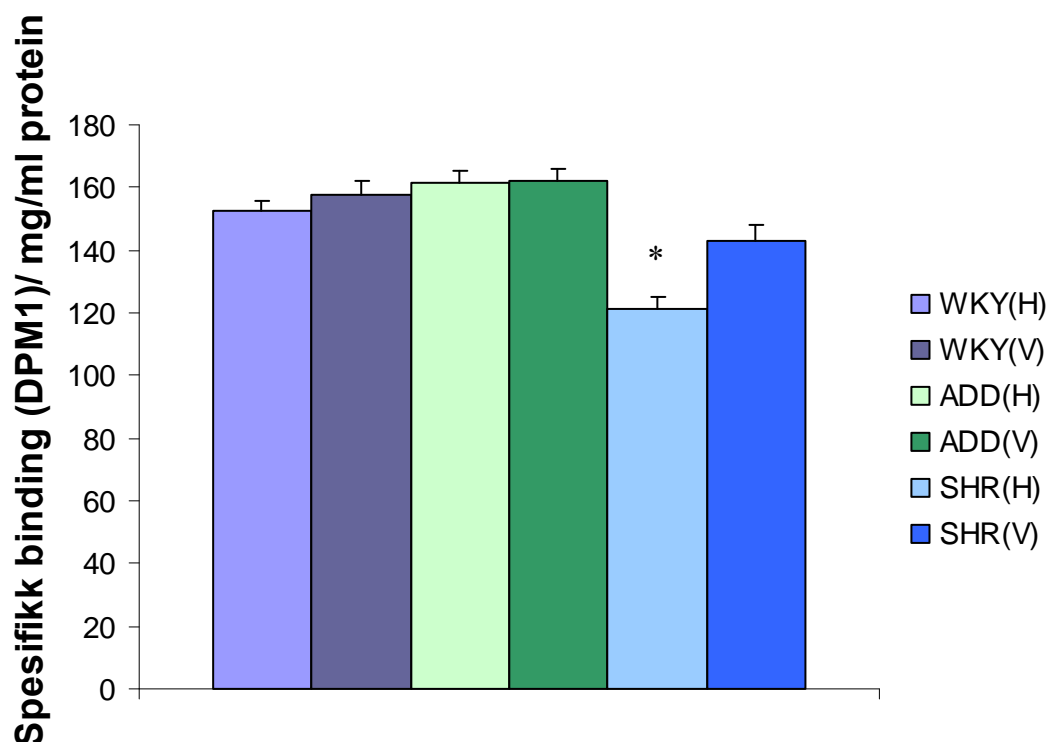
### 3.2.2 Måling av nikotinreseptor-subenheten $\alpha_4/\beta_2$

Binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenheter ble målt i venstre og høyre hjernehalvdel fra 4-5 uker gamle WKY, SHR og ADD i tillegg til hippocampus fra 5 uker gamle WKY og SHR. Membranpreparatene ble opparbeidet som i avsnitt 2.4.2. Det var interessant å undersøke om ADD og SHR-rottene har lik binding av [ $^3\text{H}$ ]Epibatidin til  $\beta_2/\alpha_4$  subenhetene og om de skiller seg fra WKY. Sammenligning av binding ble gjort mellom SHR og ADD, ADD og WKY i tillegg til SHR og WKY.

Sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$ -subenhetene ble gjort mellom venstre og høyre hjernehalvdel for å se om det er noen forskjeller. Dersom det ikke er noen betydelig forskjeller i [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binding mellom venstre og høyre hjernehalvdel vil resultatene for hver enkelt gruppe bli slått sammen når SHR, ADD og WKY skal sammenlignes. [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binding har tidligere blitt vist å kunne binde seg til to seter med ulik affinitet (Houghtling et al. 1995). Dette har også blitt reproduisert i oppgavens metodeforsøk, se avsnitt 3.1.2. [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binding ble derfor undersøkt for høyaffinitetssete (0,1 nM [ $^3\text{H}$ ]epibatidin) i tillegg til høy- og lavaffinitets binding (1 nM [ $^3\text{H}$ ]epibatidin). Det var også av interesse å se om det var forskjell i  $\beta_2/\alpha_4$  nikotinreseptor i hippocampus mellom WKY og SHR. Måling av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binding ble utført som beskrevet i avsnitt 2.7.3.

Figur 19 viser 1 nM [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor subenhetene og sammenligning av venstre og høyre hjernehalvdel fra 4-5 uker gamle WKY, ADD og SHR-rotter. Her ble det funnet at SHR hadde signifikant ( $p=0,018$ ) lavere binding på 15% i høyre hjernehalvdel i forhold til venstre. ADD og WKY dyrene viste ingen signifikant forskjell i binding mellom høyre og venstre hjernehalvdel (Tabell 4).

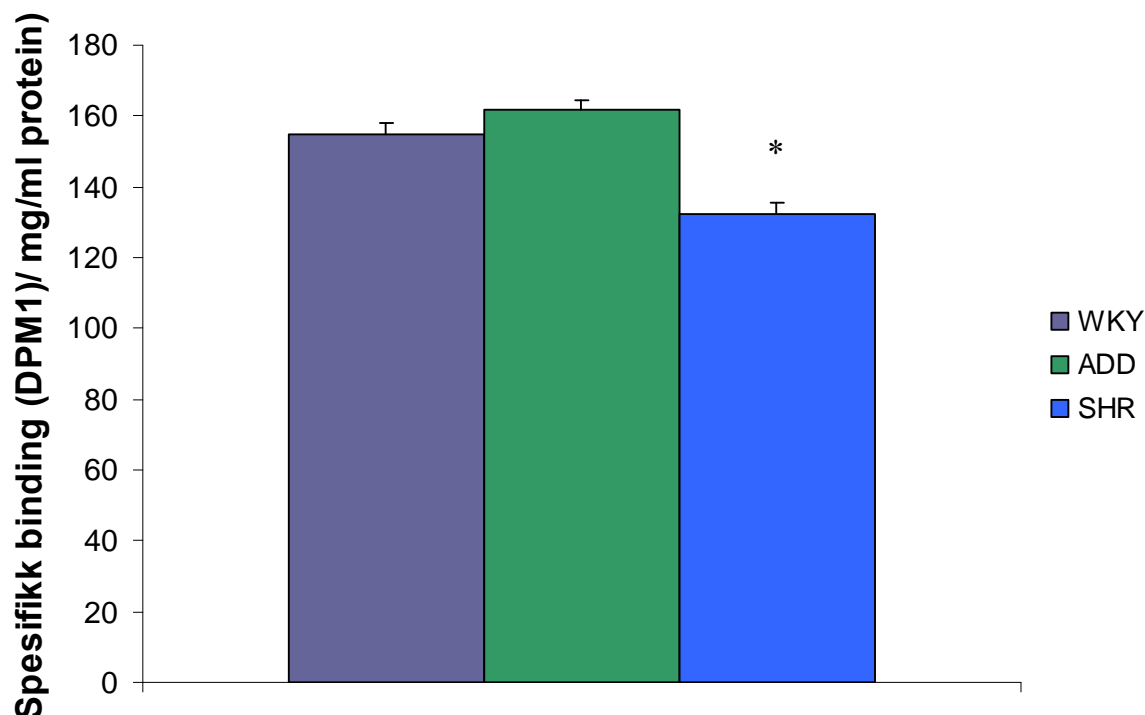
Figur 20 viser også 1 nM [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhetene, men her er høyre og venstre hjernehalvdel slått sammen. Resultatet viser at membranpreparatet fra SHR hadde 15% lavere binding til  $\alpha_4/\beta_2$  nikotinreseptor-subenhetene i forhold til WKY ( $p = 0.0007$ ). Bindingen var omtrent lik mellom membranpreparatet fra ADD og WKY og student t-test viste ingen signifikant forskjell (Tabell 5).



Figur 19: Måling av binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subbenheter med 1nM [ $^3$ H]epibatidin. Her sammenlignes høyre (H) og venstre (V) hjernehalvdel fra 4-5 uker gamle WKY, ADD og SHR. Resultatet viser signifikant lavere binding i høyre halvdel av SHR hjerne. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 8 paralleller. Forsøket ble utført to ganger.

Tabell 4: Viser sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subbenhet binding med 1nM [ $^3$ H]epibatidin mellom høyre og venstre hjernehalvdeler innenfor de ulike rottemodellene. Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor \* $p < 0,05$  viser signifikans.

Sammenligning av [ $^3$ H]epibatidin binding mellom høyre og venstre hjernedel			
Rotte	p-verdi	% forskjell	Antall rotter
Wky	0,5302	3	8
ADD	0,9388	0	8
SHR	0,0181*	15	8



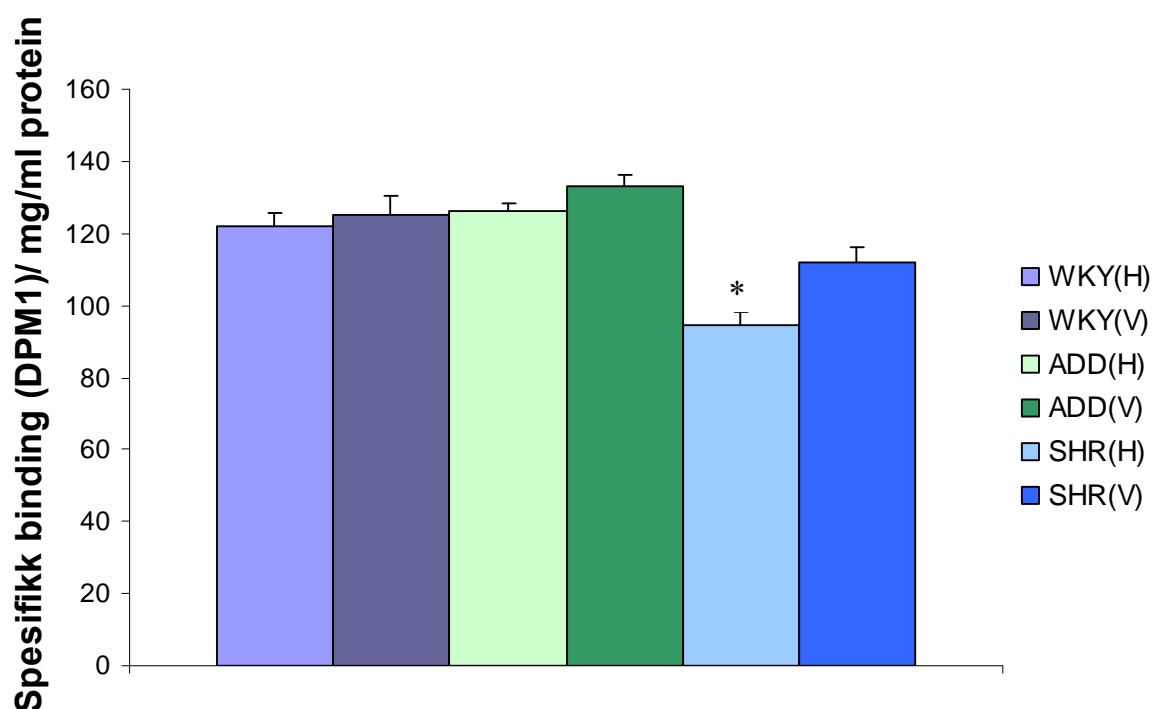
Figur 20: Binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subbenheter med 1 nM [ $^3$ H]epibatidin hvor målingene fra høyre og venstre hjernehalvdel er slått sammen. Her sammenlignes 4-5 uker gamle WKY, ADD og SHR. Resultatet viser signifikant lavere binding hos SHR i forhold til WKY. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 8 paralleller. Forsøket ble utført to ganger.

Tabell 5: Sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subbenhet binding med 1 nM [ $^3$ H]epibatidin. Tabellen viser forskjell mellom SHR og ADD rottehjerner mot WKY som kontroll, hvor binding i høyre og venstre hjernehalvdel er slått sammen. Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor \* $p < 0,05$  viser signifikans.

Sammenligning av [ $^3$ H]epibatidin binding i forhold til Wky (kontroll)			
Rotte	p-verdi	% forskjell	Antall rotter
ADD	0,2408	4	8
SHR	0,0007*	15	8

Figur 21 viser 0,1 nM [ $^3$ H]epibatidin binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhetene. Sammenligning blir gjort av venstre og høyre hjernehalvdel hos 4-5 uker gamle WKY, ADD og SHR. Her ble det funnet 16% lavere binding i høyre hjernehalvdel i forhold til venstre ( $p = 0,048$ ). ADD dyrene viste også usignifikant lavere binding på 5% i venstre hjernehalvdel i forhold til høyre. Det kan være verdt å nevne dette siden p-verdien ikke var langt fra signifikansnivå ( $p=0,065$ ). Figur 22 viser også 0,1 nM

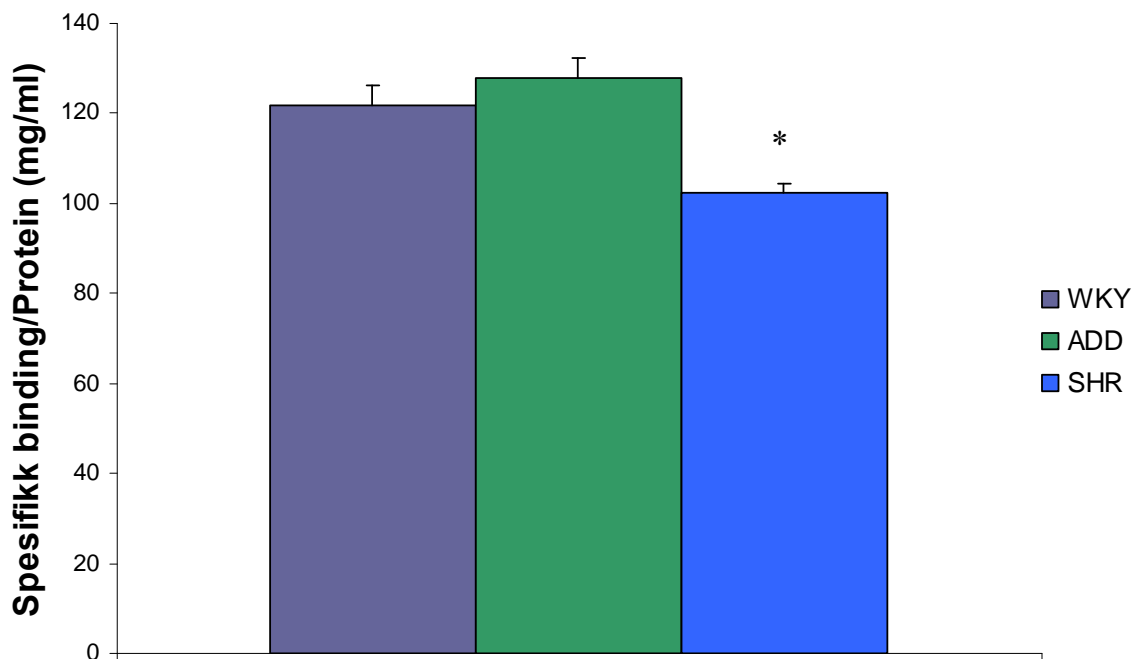
[<sup>3</sup>H]epibatidin binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenheterne, men her er høyre og venstre hjernehalvdel slått sammen. Resultatet viser at membranpreparatet fra SHR hadde signifikant lavere binding på 17% i forhold til WKY ( $p=0,006$ ). ADD hadde 5% høyere binding enn WKY hvorav forskjellen var usignifikant (Tabell 7).



Figur 21: Måling av binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenheter med 0,1 nM [<sup>3</sup>H]epibatidin. Her sammenlignes høyre (H) og venstre (V) hjernehalvdel hos 4-5 uker gamle WKY, ADD og SHR. Resultatene viser at det er signifikant lavere binding i høyre hjernehalvdel enn venstre hos SHR. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 8 paralleller. Forsøket ble utført to ganger.

Tabell 6: Viser sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhet binding med 0,1 nM [<sup>3</sup>H]epibatidin mellom høyre og venstre hjernehalvdeler innenfor de ulike rottemodellene. Tabellen viser p-verdier og prosent forskjell. Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor \* $p < 0,05$  viser signifikans.

Sammenligning forskjellig binding av [ <sup>3</sup> H]epibatidin i Høyre og venstre hjernehalvdel			
Rotte	p-verdi	% forskjell	Antall rotter
Wky	0,742	2	8
ADD	0,065	5	8
SHR	0,048*	16	8

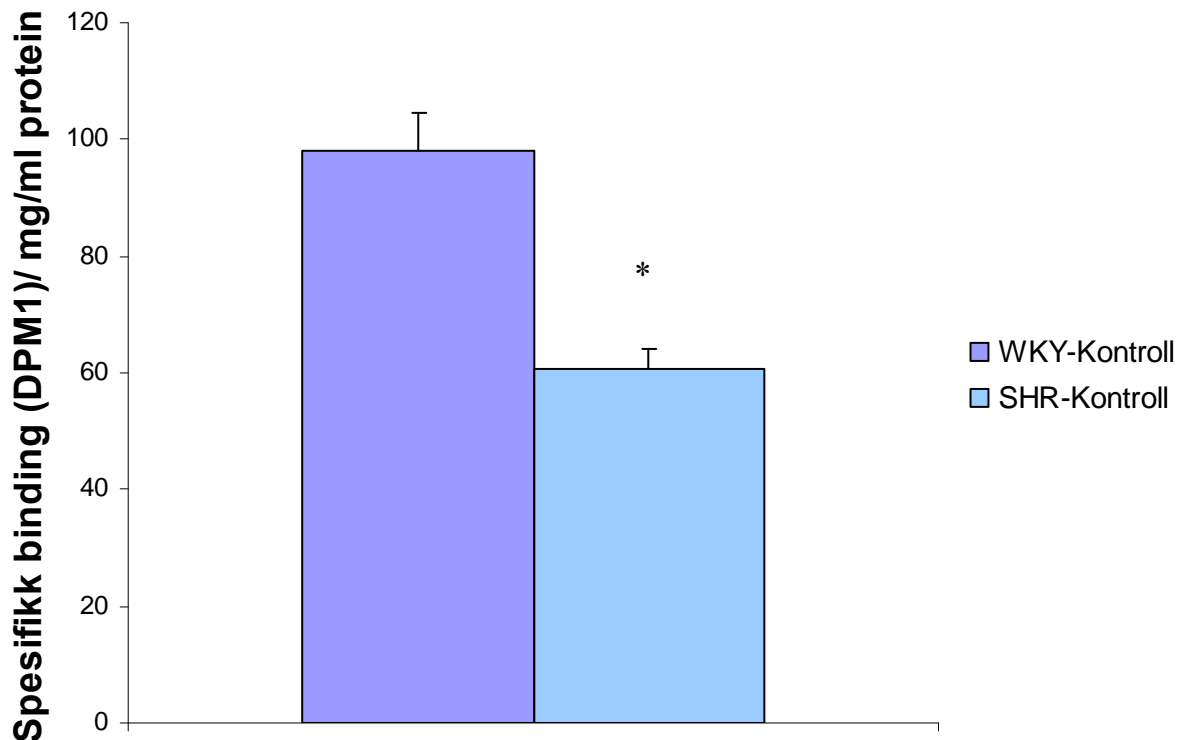


Figur 22: Binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subbenheter med 0,1 nM [ $^3$ H]epibatidin hvor målingene fra høyre og venstre hjernehalvdel er slått sammen. Her sammenlignes 4-5 uker gamle WKY, ADD og SHR. Resultatet viser signifikant lavere binding hos SHR enn WKY. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 8 paralleller. Forsøket ble utført to ganger.

Tabell 7: Sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subbenhet binding med 0,1 nM [ $^3$ H]epibatidin. Tabellen viser forskjell mellom SHR og ADD rottehjerner mot WKY som kontroll, hvor binding i høyre og venstre hjernehalvdel er slått sammen. Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor \* $p < 0,05$  viser signifikans

Sammenligning av [ $^3$ H]epibatidin Høyaaffinitetssete binding i forhold til Wky (kontroll)			
Rotte	p-verdi	% forskjell	Antall rotter
ADD	0,292	5	8
SHR	0,006*	17	8

Figur 23 viser sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$ -binding i hippocampus mellom 5 uker gamle WKY og SHR rotter. Resultatet viser at membranpreparatet av SHR-hippocampus har 38% lavere binding enn WKY. Tabell 8 viser at forskjellen er signifikant med  $p=0,0045$  ut i fra student t-test.



Figur 23: Binding til nikotinreseptor-subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  i hippocampus fra 5 uker gamle WKY og SHR med 1 nM [ $^3$ H]epibatidin. Resultatet viser signifikant lavere binding hos SHR i forhold til WKY. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 4 (SHR) og 10 (WKY) paralleller. Forsøkene ble utført 2-3 ganger.

Tabell 8: Sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhet binding på membranpreparat fra hippocampus med 1 nM [ $^3$ H]epibatidin. Tabellen viser at det er 38% forskjell mellom binding i WKY og SHR membranpreparater ( $p=0,0045$ ). Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor  $*p < 0,05$  viser signifikans.

Sammenligning av grupper		
Rotter sammenlignet	p-verdi	% forskjell
SHR kontroll - Wky kontroll	0,0045	38

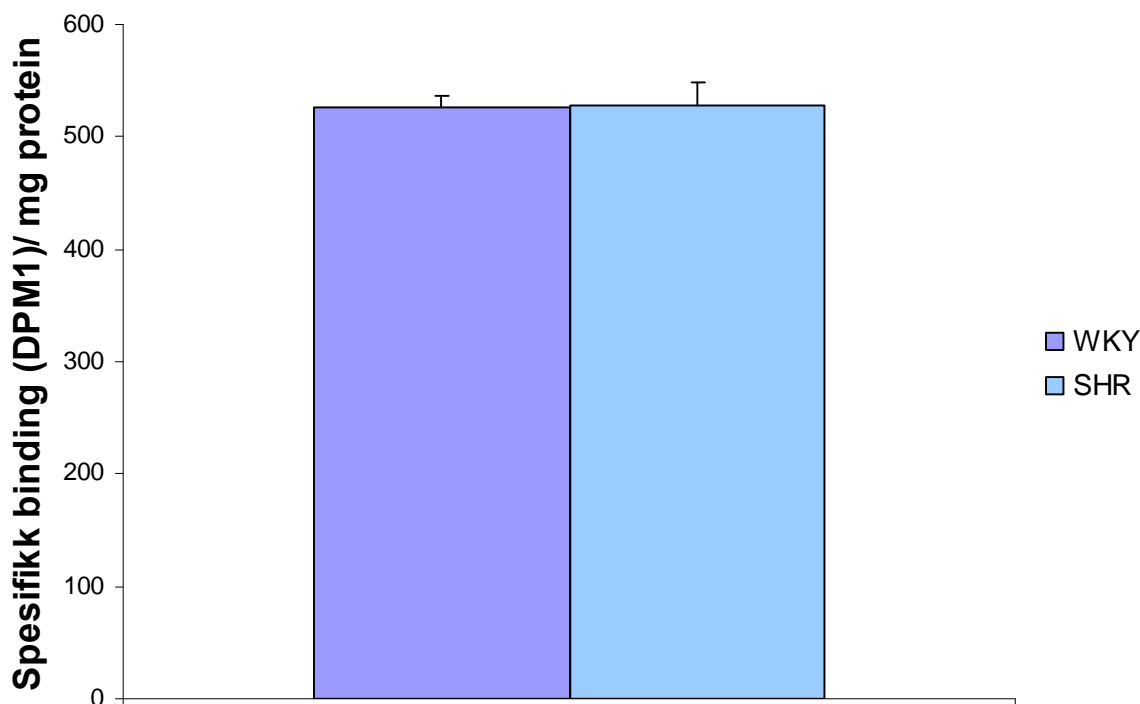
### 3.2.3 NMDA reseptor binding

Det var ønskelig å undersøke binding av NMDA-reseptorer fra hippocampus av 5 uker gamle SHR og WKY-rotter. I denne omgangen undersøkte vi nærmere bestemt

bindingen av [ $^3\text{H}$ ]Mk801 binding til NMDA reseptorer i Hippocampus.

Membranpreparatet ble opparbeidet som i avsnitt 2.4.2.

Figur 24 viser [ $^3\text{H}$ ]Mk801 binding til NMDA reseptorer i membranpreparat av hippocampus fra WKY og SHR-rotter. Resultatet viste ingen forskjeller.



Figur 24: Binding av [ $^3\text{H}$ ]Mk801 til NMDA reseptor i hippocampus av 5 uker gamle WKY og SHR. Resultatet viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene. Verdiene er oppgitt i gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 4 (SHR) og 10 (WKY) paralleller. Forsøket er utført 2 ganger.

### 3.3 Effekt av ortho-substituert PCB eksponering in vivo

Det ble valgt å måle aminosyrekonsentrasjon, generell nikotinreseptor-binding ( $\alpha_4/\beta_2$ ), dopaminreseptorbinding ( $D_1/D_5$ ) og NMDA-reseptorbinding på hjernehomogenat av rottemodeller for ADHD og kontroller eksponert for PCB180 og 153. Av hjernehalvdeler fra voksne SD-rotter ble det målt aminosyrekonsentrasjoner, binding av nikotinreseptorer ( $\alpha_4/\beta_2$ ), og dopaminreseptorer ( $D_1/D_5$ ). Fra hippocampus

---

av 5 uker gamle WKY og SHR-rotter ble det målt binding av nikotinreseptorer ( $\alpha_4/\beta_2$ ) og NMDA-reseptorer.

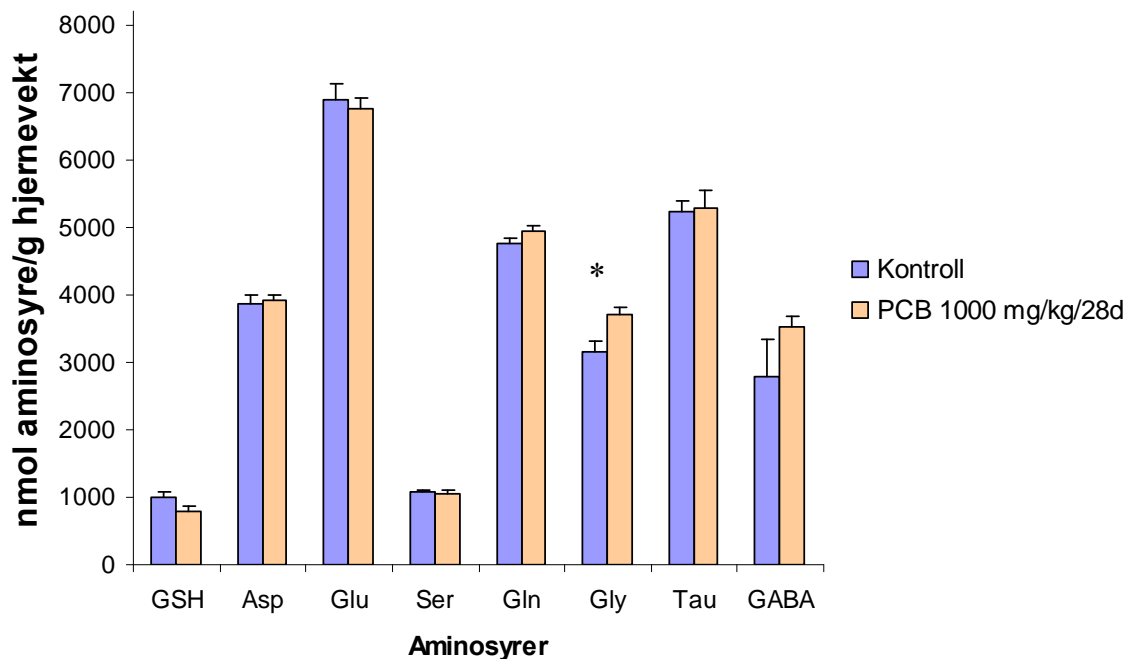
### **3.3.1 Effekt av PCB eksponering på aminosyrekonsentrasjoner**

Det ble målt aminosyrer på hjerneekstrakt fra voksne SD-rotter og 5 uker gamle WKY og SHR som har vært eksponert for PCB og deres kontroller. Aminosyremåling var av interesse for å undersøke om aminosyre konsentrasjoner i hjernen og enkelte hjernedeler er forandret hos PCB eksponerte rottemodeller sammenlignet med deres kontroller. Dersom det er en forskjell i aminosyrekonsentrasjon kan det være en mulig medvirkende årsak til endring i atferd. Aminosyreprøver ble opparbeidet fra halve hjerner og striatum som i beskrevet i avsnitt 2.4.1 og deteksjon av aminosyrene ble utført som i avsnitt 2.6.1.

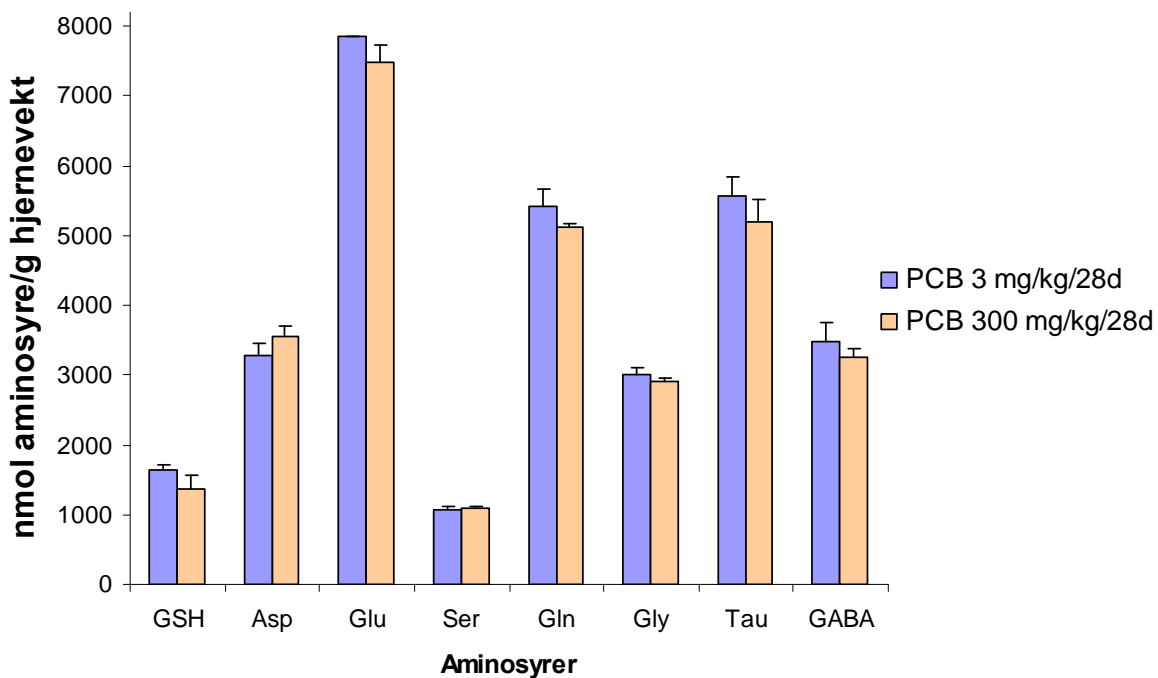
Figur 25 viser sammenligning av aminosyrekonsentrasjon fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter, som har vært eksponert for 0 (kontroll) og 1000 mg PCB180 per kg i løpet av 28 dager. For rottene eksponert for 1000 mg PCB180 per kg er det observert en signifikant oppgang i glysin på 15% ( $p = 0,04$ ) i forhold til kontroller (Tabell 9).

Figur 26 viser sammenligning av aminosyrekonsentrasjon fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter, som har vært eksponert for 3 (kontroll) og 300 mg PCB180 per kg i løpet av 28 dager. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom rotter eksponert for 3 og 300 mg PCB180 per kg (Tabell 9).





Figur 25: Aminosyrekonsentrasjoner fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter. Resultatet er sammenlignet mellom rotter eksponert for 0 og 1000 mg PCB180 per kg kroppsvekt. Det ble funnet en signifikant økning i glysin nivået hos rotter eksponert for PCB i forhold til kontroll. Resultatet er oppgitt i gjennomsnitt aminosyre  $\pm$  SEM for 6 og 4 paralleller.



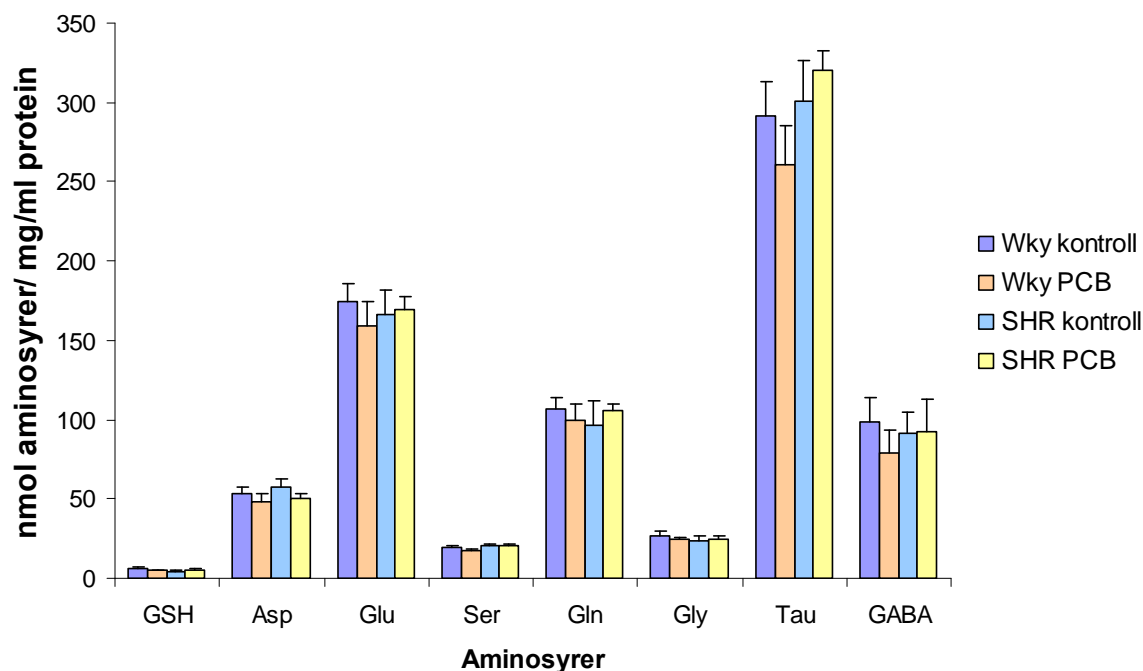
Figur 26: Aminosyrekonsentrasjoner fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter. Resultatet er sammenlignet mellom rotter eksponert for 3 og 300 mg PCB180 per

kg kroppsvekt. Resultatet viser ingen signifikante forskjeller mellom gruppene og er oppgitt igjennomsnitt aminosyre  $\pm$  SEM for 2 og 4 paralleller

Tabell 9: Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor  $*p < 0,05$  viser signifikans. Tabellen viser p-verdier for sammenligning av PCB eksponerte rotter er sammenlignet med sine kontroller. Rotter eksponert for 1000 mg PCB180 ble sammenlignet med rotter eksponert for 0 mg PCB, mens rotter eksponert for 300 mg PCB180 ble sammenlignet med rotter eksponert for 3 mg PCB180. Aminosyrene som ble målt var glutation (GSH), aspartat (Asp), glutamat (Glu), serien (Ser), glutamin (Gln), glysin (Gly), taurine (Tau), gamma-amino-smørsyre (GABA).

PCB eksponerte SD-rotter sammenlignet med SD-kontroller		
	p-verdi	
	1000 mot 0 mg PCB180	300 mot 3 mg PCB180
Aminosyre		
GSH	0,146	0,218
Asp	0,791	0,230
Glu	0,718	0,552
Ser	0,607	0,478
Gln	0,136	0,281
Gly	0,040*	0,554
Tau	0,890	0,445
GABA	0,325	0,337

Figur 27 viser sammenligning av aminosyrekonsentrasjoner målt fra striatum av 5 uker gamle WKY og SHR eksponert for 9 mg PCB153 per kilo og kontroller (avsnitt 2.3). Resultatene viser ingen signifikante forskjeller mellom aminosyrekonsentrasjoner hos noen av gruppene.



Figur 27: Sammenligning av aminosyrekonsentrasjon fra striatum. Sammenligning er gjort mellom 5 uker gamle WKY og SHR eksponert for 9 mg PCB 153 per kilo under utvikling, og deres kontroller. Resultatet viser ingen signifikante forskjeller. Figuren viser gjennomsnitt aminosyre  $\pm$  SEM for 4 paralleller.

Tabell 10: Tabellen viser sammenligning av p-verdier mellom 5 uker gamle SHR og WKY eksponert for PCB og deres kontroller i tillegg til sammenligning av SHR kontroll mot WKY kontroll. Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor  $*p < 0,05$  viser signifikans. I hver testgruppe var det 4 dyr. Aminosyrene som ble målt var glutation (GSH), aspartat (Asp), glutamat (Glu), serien (Ser), glutamin (Gln), glysin (Gly), taurine (Tau), gamma-amino-smørsyre (GABA).

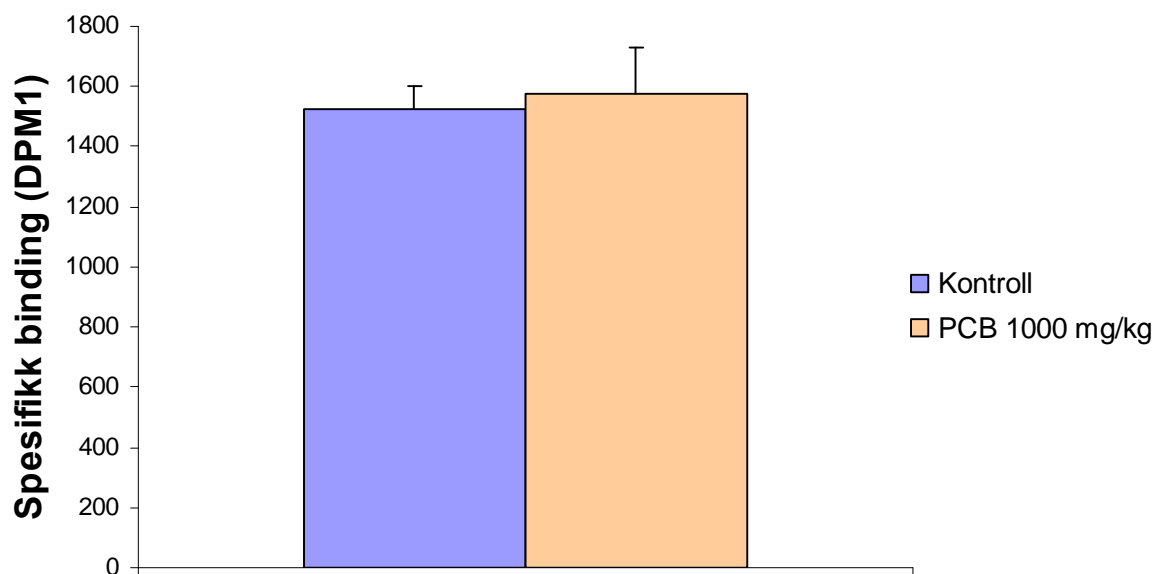
SHR og WKY rotter som har fått PCB 153 sammenlignet med deres kontroller			
p-verdi			
Aminosyre	SHR PCB mot SHR	WKY PCB mot WKY	SHR mot WKY
GSH	0,512	0,305	0,181
Asp	0,164	0,422	0,473
Glu	0,806	0,436	0,598
Ser	0,971	0,278	0,531
Gln	0,348	0,622	0,435
Gly	0,737	0,370	0,385
Tau	0,343	0,391	0,753
GABA	0,969	0,381	0,704

### 3.3.2 Effekt av PCB på nikotinreseptor-subenheteren $\alpha_4/\beta_2$

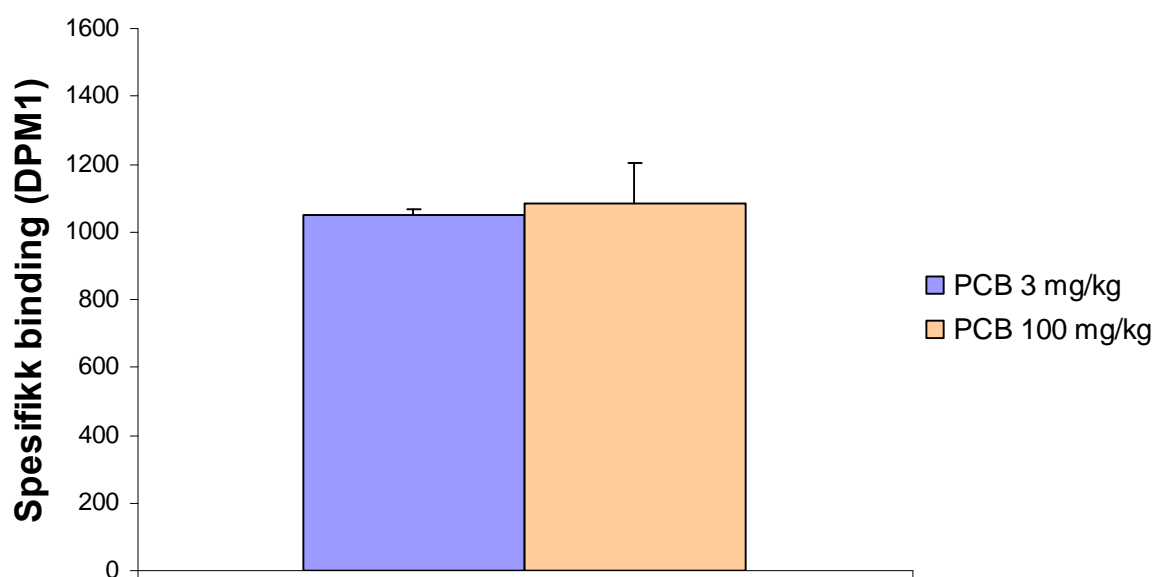
Binding av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenheter har blitt målt på membranpreparat fra hjerner av 5 uker gamle WKY, ADD og SHR. Resultatet fra disse målingene var at SHR hadde signifikant lavere binding i forhold til WKY (avsnitt 3.2.2). Det var derfor interessant å undersøke om [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenheter på membranpreparat også var lavere for rotter eksponert for PCB i forhold til kontroller. Membranpreparatene ble opparbeidet fra hjernehalvdeler fra voksne SD-rotter og hippocampus fra 5 uker gamle WKY og SHR-rotter, som beskrevet i avsnitt 2.4.2. Eksponering av rottene for PCB foregikk som forklart i avsnitt 2.3. Epibatidin binding har tidligere blitt vist å kunne binde seg til to seter med ulik affinitet (Houghtling et al. 1995). Dette har også blitt reproduisert i oppgavens metodeforsøk, se avsnitt 3.1.2. [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binding ble derfor underøkt for binding til høyaffinitetssete (0,1 nM [ $^3\text{H}$ ]epibatidin) i tillegg til lavaffinitetssete (1 nM [ $^3\text{H}$ ]epibatidin). Metoden for [ $^3\text{H}$ ]epibatidin måling er som beskrevet i avsnitt 2.7.3.

Figur 28 viser binding av 1 nM [ $^3\text{H}$ ]epibatidin til subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  i membranpreparat laget fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter. Rottene hadde blitt eksponert for 0 (kontroller) og 1000 mg PCB180 per kilo. Rottene som skal ha fått 1000 mg PCB180 per kilo viser ingen signifikant forskjell i binding av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin i forhold til kontrollene (Tabell 11).

Figur 29 viser binding av 1 nM [ $^3\text{H}$ ]epibatidin til subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  i membranpreparat laget fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter. Rottene hadde blitt eksponert for 3 (kontroller) og 100 mg PCB180 per kilo. Rottene som har fått 100 mg PCB180 per kilo viser ingen signifikant forskjell i binding av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin i forhold til kontrollene (Tabell 11). Det er derimot en tendens til at rottene eksponert for 1000 og 100 mg PCB180 har 3 prosent høyere binding enn kontroll gruppene (0 og 3 mg PCB180).



Figur 28: Binding til nikotinreseptor-subenheterne  $\alpha_4\beta_2$  med 1 nM [ $^3$ H]epibatidin på membranpreparat fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter. Resultatet viser ingen forskjell mellom eksponeringsgruppene og kontroll. Rottene som er sammenlignet er eksponert for 0 og 1000 mg PCB180 per kilo. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 4 paralleller.



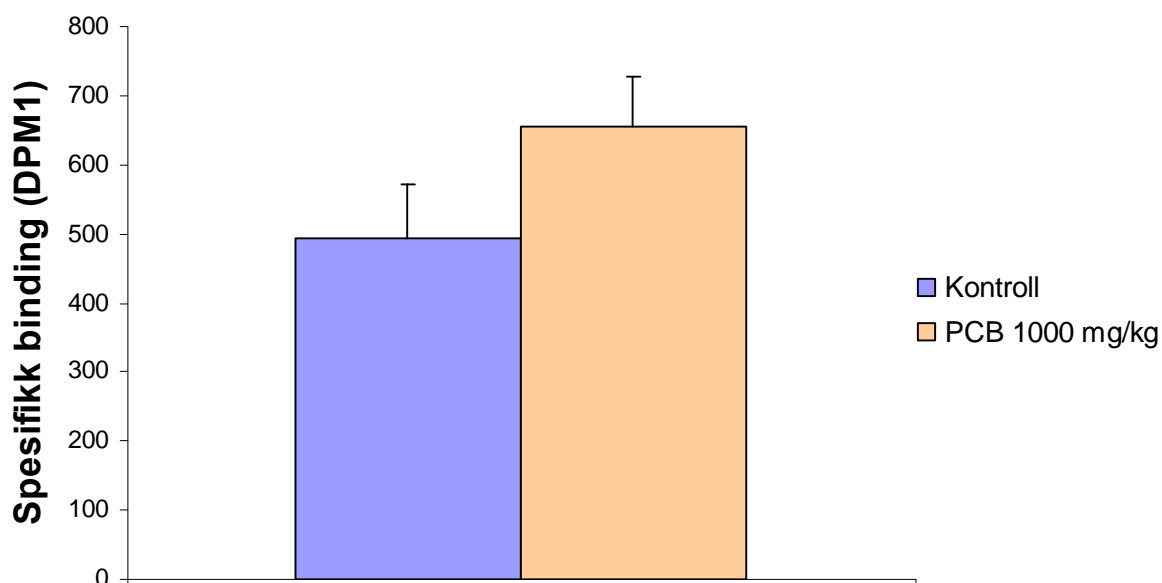
Figur 29: Binding til nikotinreseptor-subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  med 1 nM [ $^3$ H]epibatidin på membranpreparat fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter. Rottene som er sammenlignet er eksponert for 3 og 100 mg PCB 180 per kg. Resultatet viser ingen forskjeller mellom de ulike eksponeringsgruppene. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 4 paralleller.

Tabell 11: Sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhet binding på membranpreparat fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter. Bindingen ble utført med 1 nM [ $^3$ H]epibatidin. Tabellen viser p-verdier for sammenligning mellom rotter eksponert for 1000 mg PCB180 og kontroller som har fått 0 mg PCB180, i tillegg til sammenligning av rotter eksponert for 100 mg PCB180 i forhold til rotter eksponert for 3 mg PCB180. Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor  $*p < 0,05$  viser signifikans.

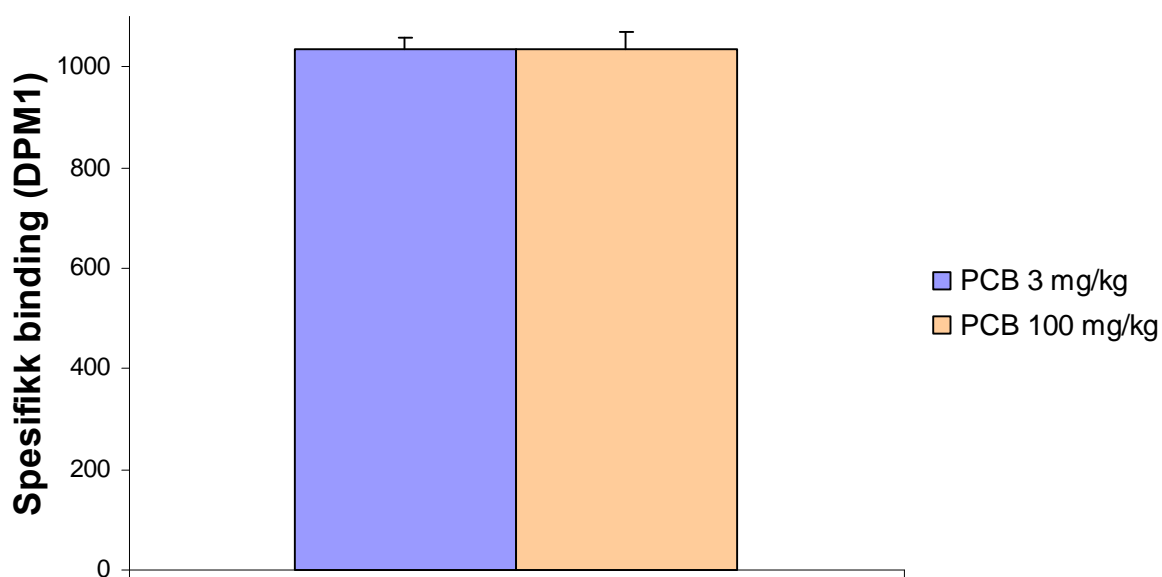
Sammenligning av Nikotinreseptor-subenhetene ( $\beta_2/\alpha_4$ )			
Eksponering PCB mg/kg/28d	Sammenlignet med (kontroll) mg PCB/kg/28d	p-verdi	Prosent forskjell
1000	0	0,74	3
100	3	0,76	3

Figur 30 viser binding av 0,1 nM [ $^3$ H]epibatidin til subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  i membranpreparat laget fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter. Rottene hadde blitt eksponert for 0 (kontroll) og 1000 mg PCB180 per kilo. Rotter eksponert for 1000 mg PCB 180 viser en ikke signifikant ( $p=0,15$ ) økning på 25% i forhold til kontroll gruppen (Tabell 12).

Figur 31 viser binding av 0,1 nM [ $^3$ H]epibatidin til subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  i membranpreparat laget fra halve hjerner av rotter. Rottene hadde blitt eksponert for 3 (kontroll) og 100 mg PCB180 per kilo. Rotter eksponert for 100 mg PCB 180 viser ingen signifikant forskjell fra kontroll gruppen (Tabell 12).



Figur 30: Binding til nikotinreseptor-subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  med 0,1 nM [ $^3$ H]epibatidin på membranpreparat fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter. Rottene som er sammenlignet er eksponert for 0 og 1000 mg PCB 180 per kilo. Det ble ikke observert noen signifikante forskjeller i binding mellom eksponerte og kontroller. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 4 paralleller.



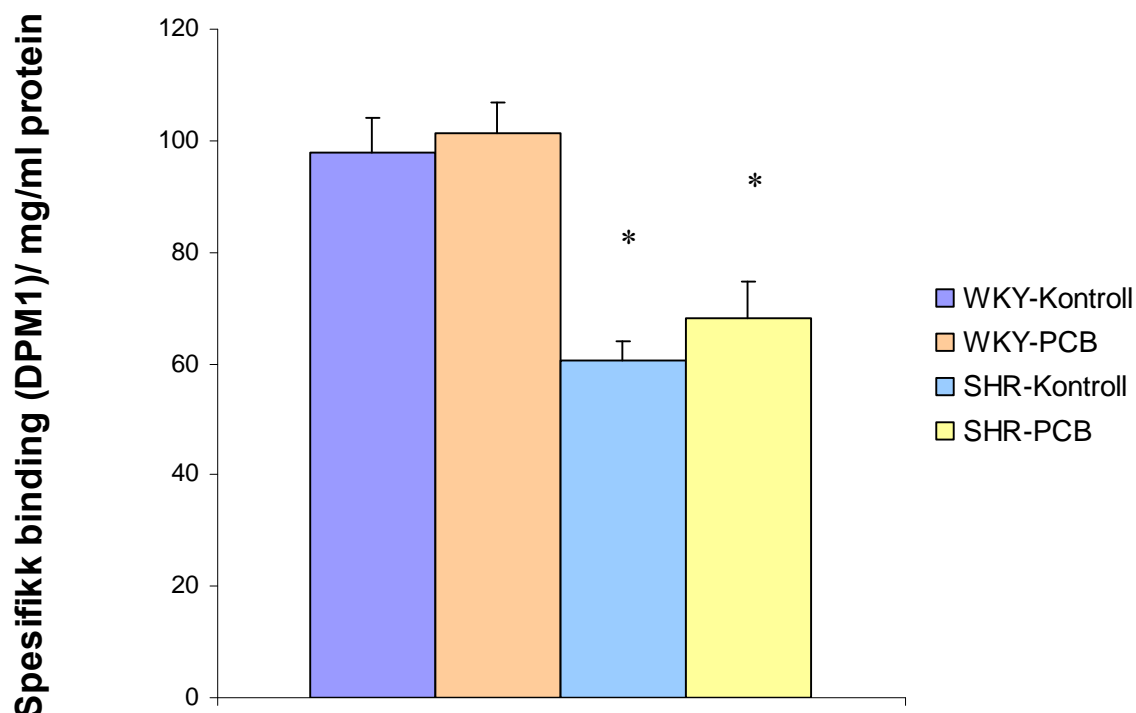
*Figur 31: Binding til nikotinreseptor-subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  med 0,1 nM [ $^3$ H]epibatidin på membranpreparat fra hjernehalvdeler av voksne SD-rotter. Rottene som er sammenlignet er eksponert for 3 og 100 mg PCB 180 per kilo. Det ble ikke observert noen forskjell i binding mellom de to eksponerings gruppene. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 4 paralleller*

*Tabell 12: Sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptor-subenhet binding på membranpreparat fra hjernehalvdeler med 0,1 nM [ $^3$ H]epibatidin. Tabellen viser p-verdier for sammenligning av SD-rotter eksponert for 1000 mg PCB180 og kontroller som har fått 0 mg PCB180, i tillegg til sammenligning av rotter eksponert for 100 mg PCB180 i forhold til rotter eksponert for 3 mg PCB180. Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor \*p < 0,05 viser signifikans.*

Eksposering PCB mg/kg/28d	Sammenlignet med (kontroll) mg PCB/kg/28d	p-verdi	Prosent forskjell
1000	0	0,15	25
100	3	0,95	0,3

Figur 32 viser sammenligning av nikotinreseptor-binding i membranpreparat av hippocampus, laget fra 5 uker gamle WKY og SHR eksponert for 9 mg PCB 153 per kilo og kontroller. Bindingen er målt med 1 nM [ $^3$ H]epibatidin til subenhetene  $\beta_2/\alpha_4$ . SHR og WKY som har fått PCB viser ingen signifikant forskjell i binding i forhold til sine kontroller (Tabell 13). Allikevel er det en tendens til noe høyere nikotinreseptor-binding (3 og 11%) hos rotter eksponert for PCB153 i forhold til kontrollene. WKY eksponert for PCB153 viser signifikant høyere binding på 33% i forhold til SHR eksponert for PCB (p=0,006). WKY kontroller viser også signifikant høyere binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -subenhetene på 38% i forhold til SHR kontrollene (p=0,0045).





Figur 32: Binding til nikotinreseptor-subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  i hippocampus med 1 nM [3H]epibatidin. Målingene er gjort på membranpreparat av hippocampus fra 5 uker gamle WKY- og SHR-rotter eksponert for 9 mg PCB 153 per kilo og kontroller. Resultatene viser signifikant forskjell mellom SHR og WKY kontroll, i tillegg til signifikant forskjell mellom SHR eksponert for PCB og WKY eksponert for PCB. Verdiene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 4 (SHR), 4 (SHR-PCB), 5 (WKY-PCB) og 10 (WKY) paralleller. Forsøkene ble utført 2-3 ganger.

Tabell 13: Sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$  nikotinreseptor-subenhet binding på membranpreparat fra hippocampus med 1 nM [3H]epibatidin. Tabellen viser forskjell mellom WKY og SHR eksponert for PCB 153 og deres kontroller. Statistikk ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor \* $p < 0,05$  viser signifikans.

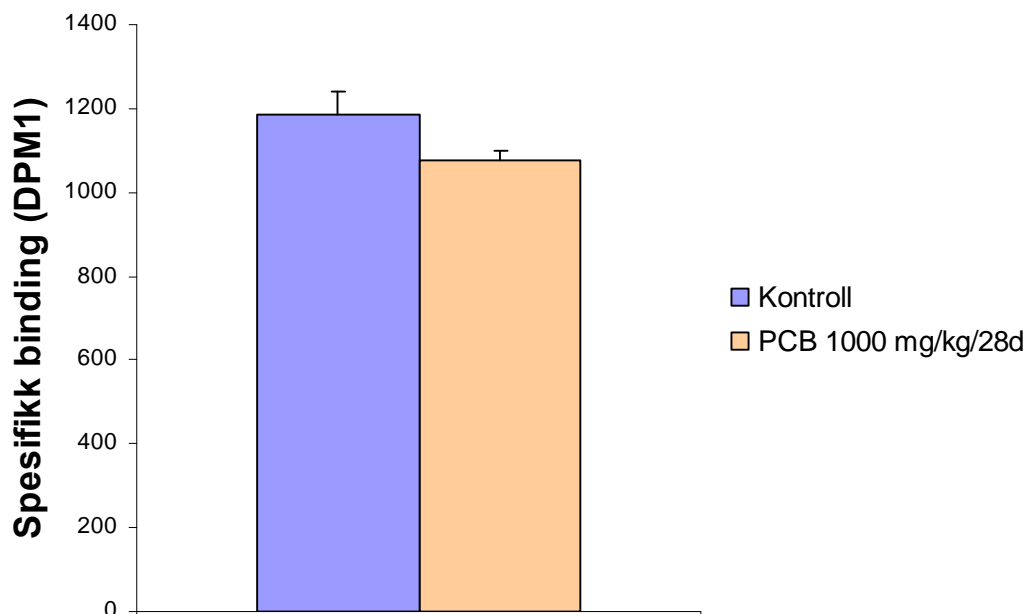
Sammenligning av grupper		
Rotter sammenlignet	p-verdi	% forskjell
Wky PCB - kontroll	0,76	3
SHR PCB - kontroll	0,33	11
SHR PCB - Wky PCB	0,006*	33
SHR kontroll - Wky kontroll	0,0045*	38

---

### 3.3.3 Effekt av PCB på D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> reseptor binding

Endringer i dopamin relaterte mekanismer har blitt koblet til ADHD, hvor man har observert lavere dopaminerg aktivitet (Johansen et al. 2005; DasBanerjee et al. 2008). Det er blitt vist at PCB eksponerte kontroll-rotter kan få atferd som ligner på den man observerer hos ADHD barn og SHR-rotter (Sagvolden og Sergeant 1998; Banerjee et al. 2007). Det var derfor ønskelig å undersøke om SD-rotter som har vært eksponert for 1000 mg/kg av PCB180 i løpet av 28 dager (i voksen alder), hadde endret dopaminreseptorbinding i forhold til kontrolldyr. Målingene ble gjort på membranpreparater isolert fra halve rottehjerner (se avsnitt 2.4.2). Målingene av D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorsubbenhetene ble utført med [<sup>3</sup>H]SCH23390 som beskrevet i avsnitt 2.7.1.

Figur 33 viser sammenligning av [<sup>3</sup>H]SCH23390-binding til D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-dopaminreseptor-subbenhetene i hjernehalvdeler, mellom voksne rotter eksponert for 1000 mg PCB180 per kilo kroppsvekt og kontroll. Resultatene viser ingen signifikant forskjellige mellom SD-rotter som har vært eksponert for PCB og kontroller (p=0,576). Statistikk er gjort med student t-test (2-halet distribusjon).

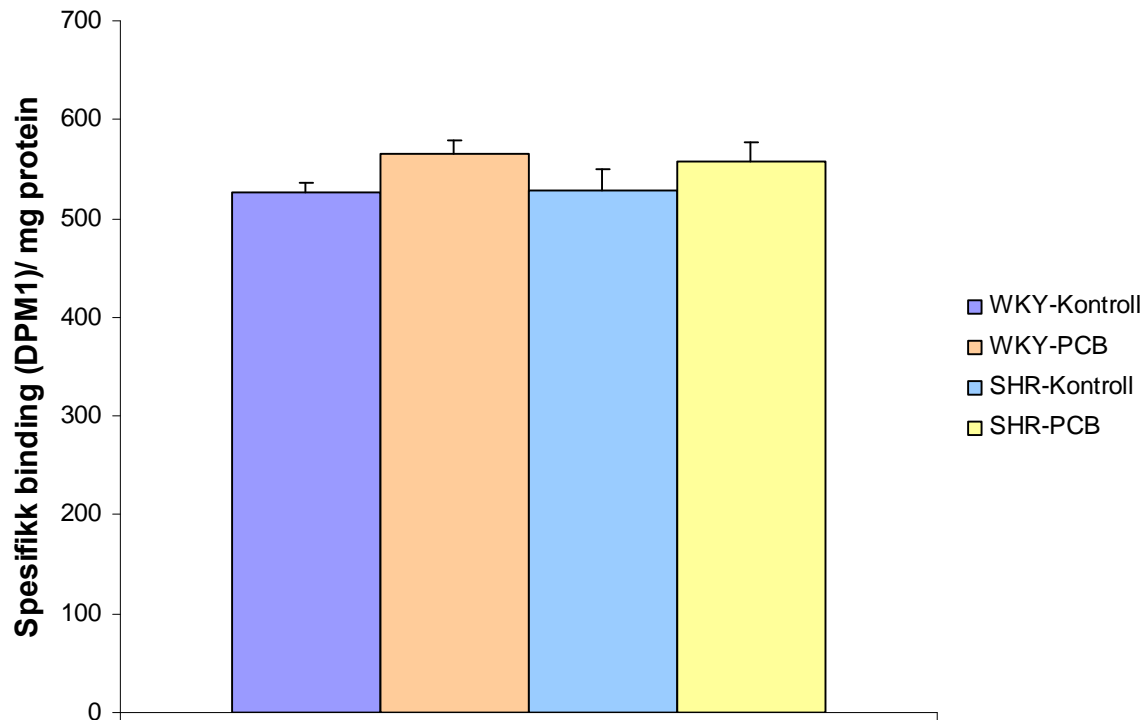


Figur 33: Sammenligning av [ $^3\text{H}$ ]SCH23390 binding til  $D_1/D_5$ -dopaminreseptor-subbenhetene i hjernehalvdeler, mellom voksne SD-rotter eksponert for 1000 mg PCB180 per kg kroppsvekt og kontroll. Resultatene viser ingen signifikante forskjeller og figuren viser gjennomsnitt spesifikk binding  $\pm$  SEM av 4 paralleller.

### 3.3.4 Effekt av PCB på NMDA reseptor binding

Det var ønskelig å undersøke om det er forandringer på NMDA-reseptorer i hippocampus fra 5 uker gamle WKY- og SHR-rotter eksponert for PCB 153 og kontroller. I denne omgangen undersøkte vi nærmere bestemt bindingen av [ $^3\text{H}$ ]Mk801-binding til NMDA-reseptorer i Hippocampus. Membranpreparatet ble opparbeidet som i avsnitt 2.4.2 og dyrene ble eksponert for 9 mg PCB153 per kg kroppsvekt som beskrevet i avsnitt 2.3.

Figur 34 viser [ $^3\text{H}$ ]Mk801-binding til NMDA-reseptorer i membranpreparat fra hippocampus og sammenligning mellom 5 uker gamle WKY og SHR eksponert for PCB153 og kontroller. Resultatet viser ingen signifikante forskjeller mellom [ $^3\text{H}$ ]Mk801 binding til NMDA-reseptorer hos noen av gruppene (Tabell 14). Men det kan se ut som en tendens til at PCB153 eksponerte WKY og SHR har høyere binding enn ueksponerte (kontroller).



Figur 34: Binding av [<sup>3</sup>H]Mk801 til NMDA-reseptorer i hippocampus på 5 uker gamle SHR og WKY rotter eksponert for PCB og kontroller. Ingen av gruppene viste seg å være signifikant forskjellig. Verdiene er oppgitt i gjennomsnitt ± SEM av 4 (SHR), 4 (SHR-PCB), 5 (WKY-PCB) og 10 (WKY) paralleller. Forsøket er utført 2 ganger.

Tabell 14: Tabellen viser sammenligning av p-verdier. Ingen av gruppene viste seg å være signifikant forskjellig. Statistikken ble gjort med student t-test (2-halet distribusjon) hvor \*p < 0,05 viser signifikans. Av SHR dyr er det brukt 4 dyr i hver gruppe. Mens av WKY dyr er det 5 eksponert for PCB og 10 kontroller.

Sammenligning av grupper		
Rotter sammenlignet	p-verdi	% forskjell
Wky PCB – kontroll	0,095	5,3
SHR PCB – kontroll	0,408	6,9
SHR PCB - Wky PCB	0,878	1,3
SHR kontroll - Wky kontroll	0,770	0,4

## 4. Diskusjon

### 4.1 Metodeforsøk

Testing om PCA-felling og BSA-proteiner påvirker aminosyrekonsentrasjoner ble utført som beskrevet i avsnitt 2.6.2, for å undersøke om metoden som ble brukt for aminosyre-ekstrahering (2.4.1) var tilstrekkelig god. Ingen tydelig konsentrasjonsforskjell ble observert mellom aminosyre-standarder behandlet med PCA og BSA-protein, og kontroller (3.1.1). Dette viser at PCA ikke forandrer aminosyresammensetningen eller påvirker aminnosyre-konsentrasjonene. I tillegg viser resultatet at aminosyrene ikke binder seg i betydelig grad til BSA-proteiner etter PCA-behandling.

Metodeforsøk ble utført for radioligandmåling av nikotinreseptor-subenhetene  $\alpha 4/\beta 2$  og  $\alpha 7$  med [ $^3\text{H}$ ]epibatidin og [ $^3\text{H}$ ]methyllycaconitin som beskrevet i avsnitt 2.7.2 og 2.7.5, for å optimalisere forholdene for radioligandbinding til reseptorene. Ved slike forsøk er det mest optimalt å få høyest mulig spesifikk binding i forhold til uspesifikk. Den spesifikke bindingen vil si binding av radioaktiv ligand til reseptoren av interesse. Totale bindingsverdier ble funnet ved å måle all binding med radioaktiv ligand, mens uspesifikk binding ble målt ved å i tillegg tilsette en umerket ligand som blokkerer for bindingssetet av interesse. Hvor optimal metoden er kommer an på hvor spesifikk radioliganden er til sin målreseptor, men også parametre som inkuberingstid, inkuberingstemperatur, vaskeprosedyre og proteinkonsentrasjoner er viktige. Vi valgte derfor å studere disse parametrene i tillegg til å lage metningskurver av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin- og [ $^3\text{H}$ ]methyllycaconitin-binding.

Ved inkubering av radioligand sammen med membranpreparat forventes det at bindingen skal øke raskt i starten for så å flate ut. I starten vil ikke all radioaktivitet ha rukket å binde seg og man ser en konstant økning med tiden. Når stigningskurven for bindingen har flatet ut viser det at binding av reseptorer og uspesifikk binding har

nådd likevekt. Hvor lang tid det tar før radioligandbinding har nådd likevekt varierer med radioligandens fysiske egenskaper og reseptoren som den binder seg til. Ved undersøkelse av ulike inkuberingstider viste det seg at den spesifikke bindingen av [<sup>3</sup>H]epibatidin til  $\alpha 4/\beta 2$  nikotinreseptor-subenheter stabiliserte seg etter 30 min. For [<sup>3</sup>H]methyllaconitin ble den spesifikke bindingen også holdt stabilt etter inkuberingstider på 30 min. For senere forsøk ble det bestemt å bruke en inkuberingstid på 60 min for [<sup>3</sup>H]epibatidin og 90 min for [<sup>3</sup>H]methyllaconitin. Det ble valgt lengre inkuberingstider enn 30 min slik at det var helt sikkert at radioliganden hadde nådd likevekt. Disse inkuberingstidene ble også valgt siden de ikke krevde for lang ventetid, i tillegg til at de viste relativt høy spesifikk binding i forhold til resten av inkuberingstidene.

Vi var interessert å undersøke hvor stor innvirkning temperaturen hadde på spesifikk og uspesifikk binding. Resultatet viste at spesifikk binding av [<sup>3</sup>H]methyllaconitin var 19% høyere ved inkubering ved romtemperatur enn is. Derfor ble det valgt å fortsette med inkubering ved romtemperatur ved senere forsøk.

Etter inkubering med radioligand ble løsningen filtrert. For å minske uspesifikk filterbinding var det derfor nødvendig å skylle filteret med stoppbuffer. Ulike skyllevolum har tidligere blitt testet ut i vårt laboratorium og viste seg å ha liten effekt på spesifikk binding. Derimot var det interessant å teste ulike antall skyllinger. For [<sup>3</sup>H]epibatidin ble det valgt å bruke 3 ml som skyllevolum og 1-8 skyllinger av filteret ble testet. Resultatet viste at 3 ganger 3 ml skylling gav lav uspesifikk binding og høy totalbinding. For [<sup>3</sup>H]methyllaconitin ble det valgt å bruke 2 ml som skyllevolum og 1-4 skyllinger av filteret ble testet. Siden den spesifikke bindingen var høy og stabil etter 3 vask, ble det derfor valgt å skylle 3 ganger med 3 ml stoppbuffer.

Spesifikk radioligandbinding forventes å øke proporsjonalt med proteinkonsentrasjonen siden det da blir flere tilgjengelige bindingssteder for liganden. Det var ønskelig å finne laveste konsentrasjon av membranhomogenat som ga tilstrekkelig høy spesifikk binding for [<sup>3</sup>H]epibatidin og [<sup>3</sup>H]methyllaconitin. Våre

---

resultater viste proporsjonal økning i spesifikk binding med økende proteinkonsentrasjon. For [ $^3\text{H}$ ]epibatidin-binding var en proteinkonsentrasjon på ca 0,25 mg protein per ml tilstrekkelig. For bindingsstudier med [ $^3\text{H}$ ]methyllycaconitin var langt høyere proteinkonsentrasjoner nødvendig for å oppnå tilstrekkelig spesifikk-binding. For å redusere bruk av membranhomogenat ble det valgt å bruke en total proteinkonsentrasjon på ca 3 mg per ml ved senere måling av [ $^3\text{H}$ ]methyllycaconitin binding til nikotinreseptor-subenheten  $\alpha_7$ .

Metningskurver ble undersøkt for bindingen av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin og [ $^3\text{H}$ ]methyllycaconitin for å finne radioligandkonsentrasjoner som ga høyest mulig spesifikk binding. Resultatet viste at spesifikk binding til nikotinreseptor-subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  økte raskt ved lave konsentrasjoner mellom 0 til 1 nM og flatet ut ved konsentrasjoner høyere enn 1 nM. [ $^3\text{H}$ ]Epibatidin-bindingskurven hadde to utflatningskonsentrasjoner, én etter 0,1 nM og den andre etter 1 nM. Dette viser at [ $^3\text{H}$ ]epibatidin-binding til nikotinreseptor-subenhetene har to metningspunkter, hvor binding kan skje til høyaffinitets-bindingssete med en konsentrasjon på 0,1 nM og til lavaffinitets bindingssete ved 1 nM. At [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binder seg til to seter stemmer overens med forsøk gjort av Houghtling et al. (1995), derimot viste Houghtling et al. at [ $^3\text{H}$ ]epibatidin hadde andre affinitetsverdier på 0,015 nM og 0,36 nM. Metningskurven for [ $^3\text{H}$ ]methyllycaconitin-konsentrasjoner mellom 0-5 nM viste at spesifikk binding til nikotinreseptor-subenheten  $\alpha_7$  økte raskt ved lave konsentrasjoner mellom 0-2 nM og flatet deretter ut fra 2-5 nM. At den spesifikke bindingen lar seg mette ved bruk av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin og [ $^3\text{H}$ ]methyllycaconitin er en god indikasjon på at metoden fungerer.

---

## 4.2 Aminosyrekonsentrasjoner og reseptorbinding i hjernen fra ADHD-rottemodeller

### 4.2.1 Aminosyrekonsentrasjoner

Undersøkelsen av aminosyrekonsentrasjoner i hele hjerner fra 5 uker gamle kontroller (WKY) og ADHD-rottemodell (SHR) viste ingen signifikante forskjeller i glutamat-, glutamin- og GABA-konsentrasjoner (avsnitt 3.2.1). Derimot viste det seg at SHR-rottene hadde 24% mindre aspartat ( $p=0,013$ ) og 10% mer glysin ( $p=0,033$ ) enn WKY i totalhjerne. Da målingene ble gjort på striatum fra 5 uker gamle WKY og SHR ble det ikke funnet forskjeller i aminosyrekonsentrasjonene.

Konsentrasjonsforskjellen av aspartat og glysin må derfor være lokalisert i andre hjerneområder enn striatum. aspartat er en veldig potent agonist for NMDA-reseptoren og kan sammen med glysin aktivere denne reseptoren. Det har lenge vært tvil om aspartats rolle i nervesystemet siden det ikke hadde blitt påvist noen vesikulære lagringsmekanismer for denne aminosyren. Forsøk av Miyaji et al. (2008) gjort på hippocampus, har gitt resultater som antyder at sialin (som er et lysosomalt  $H^+$ /sialinsyre kotransporter) virker som aspartat/glutamat transportør, og pumper disse inn i proteoliposomer. Det er derfor mulig at aspartat har en betydelig rolle som neurotransmitter.

Sammenligning av aminosyremålinger i SHR og WKY-hjerner har tidligere kun blitt gjort for GABA. Sammenligning av GABA konsentrasjoner fra gamle SHR (som har utviklet hypertensjon) og WKY (Sasaki et al. 1992) viste at det ikke var noen signifikante forskjeller i GABA-konsentrasjoner i medulla oblongata og hypothalamus. Målinger av GABA-konsentrasjoner har også blitt gjort på homogenat av hele hjerner fra voksne SHR- og WKY-rotter og her ble det heller ikke funnet forskjeller (Al-Awadi et al. 2006). Disse to forsøkene støtter resultatene i denne oppgaven, som heller ikke viser noen signifikante forskjeller i GABA konsentrasjoner.



#### 4.2.2 Måling av nikotinreseptor-subenhetene $\alpha_4/\beta_2$ med [ $^3\text{H}$ ]epibatidin

Alle resultatene fra målinger av lav- og høyaffinitets-binding til  $\alpha_4/\beta_2$ -subenhetene var omtrent like og vil derfor ikke bli behandlet separat. Målinger av [ $^3\text{H}$ ]epibatidin binding til  $\alpha_4/\beta_2$  subenheter i hjernehalvdeler fra 4-5 uker gamle WKY-, ADD- og SHR-rotter viste at SHR hadde 15-16% signifikant høyere binding i venstre hjernehalvdel sammenlignet med høyre. WKY og ADD viste ingen signifikante forskjeller mellom de ulike hjernehalvdelene, noe som viser til at dette er spesielt for SHR. Generelt var bindingstallene i begge hjernehalvdelene og hippocampus hos SHR signifikant lavere enn bindingstallene for WKY og ADD. Da vi slo sammen målingene for hjernehalvdelene hos alle gruppene viste SHR totalt 15-17% signifikant lavere  $\alpha_4/\beta_2$ -binding enn WKY og ADD. Ved målinger av  $\alpha_4/\beta_2$ -nikotinreseptorer i hippocampus av 5 uker gamle SHR-rotter ble det oppdaget 38% signifikant lavere binding hos SHR enn WKY. Fra de samme rottene har det også blitt målt aminosyrer fra striatum, hvor det ikke ble funnet noen forskjeller. Forskjellene i binding til  $\alpha_4/\beta_2$  nikotinreseptor-subenhetene kan enten bety at det er lavere nivå av reseptortypen, eller at subenhetene kan være strukturelt endret slik at [ $^3\text{H}$ ]epibatidin ikke greier å binde seg like effektivt.

I tidligere studier av nikotinreseptorer hvor WKY- og SHR-rotter har blitt sammenlignet, har det for det meste blitt brukt voksne rotter. Av den grunn har SHR-rottene allerede utviklet høyt blodtrykk. Våre studier ble foretatt på 4-5 uker gamle rotter, som ikke hadde rukket å utvikle høyt blodtrykk. Alderen hos SHR-rotter av stor betydning siden høyt blodtrykk kan ha innvirkning på utviklingen av kognitive svekkelser og demens, i tillegg til hjerneatrofi, tap av nerveceller og gliale reaksjoner (Amenta et al. 2003).

Masterstudent Ole Rostad som også gjorde forsøk i vårt laboratorium, undersøkte binding av  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-binding med radioliganden [ $^3\text{H}$ ]methyllylcaconitin i hippocampus og cerebrum hos 4-5 uker gamle WKY-, SHR- og ADD-rotter (Rostad 2009). Rostad og medarbeidere fant 14% signifikant lavere  $\alpha_7$ -nikotinreseptor-

binding i cerebrum hos SHR og 26% signifikant høyere binding hos ADD sammenlignet med WKY.  $\alpha_7$ -Nikotinreseptor-binding fra hippocampus viste ingen forskjell mellom WKY, SHR og ADD (Rostad 2009).

Yamada et al. (1987) fant også signifikant nedsatt binding på generell nikotinreseptor-binding hos en variant av SHR-rotter som lett får slag (SHR-SP) sammenlignet med WKY. Forskjellene ble funnet i hjernedeler som cerebral cortex, thalamus, midthjernen, cerebellum og medulla oblongata. Forsøket ble utført på 16-24 uker gamle rotter, slik at disse rottene var mye eldre enn de som ble benyttet i våre forsøk og hadde utviklet hypertensjon. Yamada og medarbeidere benyttet [ $^3$ H]nikotin, som binder seg til alle nikotinreseptorer, i motsetning til [ $^3$ H]epibatidin som i hovedsak binder seg til  $\alpha_4/\beta_2$ -subenhetene. Det ble ut fra Scatchard-analyse foreslått at det kunne foreligge endringer i reseptortettheten. Nikotinreseptor-subenhetene  $\alpha_4/\beta_2$  ble også målt av Gattu et al. (1997) i frontalbarken, caudate putamen, thalamus, superior colliculus og interpeduncular nucleus, hos 12 uker gamle SHR- og WKY-rotter med [ $^3$ H]cytisin som binder seg til  $\alpha_4/\beta_2$ . I samsvar med våre resultater ble det målt signifikant lavere nikotinreseptor-binding (25%) hos SHR i forhold til WKY. Siden rottene i denne studien var så mye som 12 uker hadde disse utviklet hypertensjon, i motsetning til rottene benyttet i våre forsøk. Nedsatt binding ble også målt på nikotinreseptor-subenheten  $\alpha_7$  fra SHR-rotter sammenlignet med WKY, men forskjellen var kun begrenset til enkelte hjerneområder. Målingene ble utført ved hjelp av [ $^{125}$ I] $\alpha$ -bungarotoksin som binder seg til  $\alpha_7$ -subenheten, (Gattu et al. 1997). Fra hjernehomogenatet ble det også målt vesikulære acetylkolin-transportører med [ $^3$ H]vesamicol, for å undersøke forandringer i tettheten av kolinerge nevroner. Resultatet viste at det ikke var forskjeller i [ $^3$ H]vesamicol-binding hos SHR-rotter sammenlignet med WKY, noe som tyder på at forandringene i nikotinreseptorer ikke skyldes endret tetthet av kolinerge nevroner. Ferrari et al. (1999) målte i tillegg til nedsatt  $\alpha_7$ -binding også lavere  $\alpha_7$ -mRNA-nivåer i kortikale områder av hjernen (inkludert hippocampus) til 5-6 uker gamle SHR-SP rotter, sammenlignet med WKY. Ferrari og medarbeidere fant derimot ingen forskjeller i

---

$\alpha_4/\beta_2$ -subenhetbinding med [ $^3\text{H}$ ]epibatidin på kortikale områder og heller ingen forskjeller i  $\alpha_4/\beta_2$ -mRNA-nivået mellom SHR-SP og WKY.

Studien til Ferrari et al. (1999) som ikke viste signifikante forskjeller i  $\alpha_4/\beta_2$ -binding mellom SHR-SP og WKY i kortikale områder, stemmer ikke med våre resultater. Dette kan skyldes at rottestammen SHR-SP ikke er genetisk identisk med SHR. Resultatene fra Yamada et al. (1987) tyder på at forskjellene mellom WKY- og SHR-målinger kan skyldes endret nikotinreseptornivå. Som igjen skyldes endret mRNA nivå (Ferrari et al. 1999).

Muskarinerge acetylkolinreseptorer ble også målt av Yamada et al. (Yamada et al. 1987) med [ $^3\text{H}$ ]cismethyldioxolane hos 16-24 uker gamle SHR-SP og WKY. Her ble det kun målt signifikant høyere binding hos SHR-SP sammenlignet med WKY i hypothalamus. Gattu et al. (1997) undersøkte binding av muskarin-reseptorer ( $M_1$  og  $M_2$ ) i hjerner hos 4 uker gamle SHR og WKY med reseptor-audiografi, og målte mRNA-nivåer med Real-Time-PCR. I forsøket ble det funnet signifikant økte verdier av  $M_2$  i rostrale ventrolateral medulla ved måling med [ $^3\text{H}$ ]AFDX 384. I tillegg ble det målt signifikant høyere  $M_2$ -mRNA-nivåer i medulla oblongata. Målingene som har blitt gjort på muskarinerge nikotinreseptorer tyder på forhøyet nivå i hjernedeler fra SHR-rotter i forhold til WKY-rotter. Muskarinreseptor-nivåene ser derfor ikke ut til å følge samme SHR og WKY-forholdene som de nikotinerge acetylkolinreseptorene, som viser nedsatt binding i hjernen fra SHR i forhold til WKY-rotter.

Siden økt nikotinreseptor-stimulering regnes for å forbedre konsentrasjonen, forventes lavere nivå av nikotinreseptorer å gi dårligere konsentrasjon. Det kan derfor se ut som en sammenheng mellom nedsatt nikotinreseptor-binding og konsentrasjonssvekkelsen som man ser hos SHR-rottene.

### 4.2.3 Måling av NMDA-reseptorer med [<sup>3</sup>H]Mk 801

NMDA-reseptorer er viktige for læring og hukommelse, men kan også være involvert i eksitotoksitet (Myhrer 1993; Hollmann og Heinemann 1994). NMDA-avhengig LTP i sentralnervesystemet regnes for å være en viktig mekanisme for læring og hukommelse og hippocampus er et spesielt viktig område for dette (Racine et al. 1983; Fonnum et al. 1995). Siden ADHD-rottemodeller (SHR) viser nedsatt læringsevne i forhold til normale rotter (WKY) var det ønskelig å undersøke om dette kunne skyldes endringer av NMDA-reseptorer.

Målingene av NMDA-reseptorbinding i hippocampus fra 5 uker gamle WKY- og SHR-rotter viste ingen forskjeller. Målinger av NMDA-reseptorbinding vha [<sup>3</sup>H]Mk801 har også blitt målt av Yao og Lawrence (2005). Målingene deres ble gjort i den sentrale grå substans i pons (ligger i hjernestammen) fra SHR og WKY, og viste ingen signifikante forskjeller. Derimot ble det funnet signifikant høyere tetthet av [<sup>3</sup>H]Mk801-bindingssteder hos SHR i forhold til WKY i nucleus coreulus (ligger i hjernestammen). Rottene som ble brukt var gamle (16-18 uker) og hadde utviklet hypertensjon, mens rottene som vi studerte var 4-5 uker gamle. Siden Yao og Lawrence (2005) fant forskjeller i NMDA-reseptorer mellom SHR og WKY i nucleus coreulus men ikke i sentrale grå substans i pons, kan dette antyde at det kan være endringer lokalisert kun i enkelte hjernedeler.

Forsøk gjort av Jensen et al. (Jensen et al. 2009) viser derimot dysfunksjonelle NMDA-reseptorer i glutamaterge synapser i hippocampus i SHR-rotter. Dette ble studert ved hjelp av elektrofysiologiske analyser av hippocampus fra 4-12 uker gamle SHR som viste redusert synaptisk transmisjon sammenlignet med WKY. Måling av LTP viste ingen forskjeller mellom SHR og WKY. Ved tilsetning av et stoff som spesifikt blokkerer bindingssteder på NR2B-subenheten (CP-101,606) viste SHR rottene 50% reduksjon i LTP. CP-101,606 hadde derimot ingen effekt hos WKY-kontrollene.

Dette tyder på at LTP i SHR-rottene i større grad er avhengig av NMDA-reseptor subenhetene NR2B sammenlignet med WKY. NMDA-avhengig LTP i sentralnervesystemet regnes for å være en viktig mekanisme for enkelte læringsformer og er derfor av stor interesse for å studere SHR-rottens lærevansker. Selv om NMDA-reseptorbinding ikke ble funnet å være forskjellig hos SHR- og WKY-rotter i hippocampus, kan det fortsatt være forskjeller i andre hjernedeler. Resultatene til Jensen et al. (Jensen et al. 2009) antyder at NMDA-reseptor-funksjon kan være endret uten at det er forskjeller i NMDA-reseptorbinding.

### 4.3 Effekt av ortho-substituert PCB-kongenerer in vivo

Hjernehomogenatet fra voksne SD-rotter som var eksponert for 0 og 1000 mg PCB180 per kg ble preparert samtidig og parallelt. Derimot ble hjernehomogenatet fra voksne SD-rotter som var eksponert for 3, 100 og 300 mg PCB180 per kg preparert samtidig ved et senere tidspunkt. Ved målinger av aminosyrer og nikotin reseptorer skilte rottene eksponert for 3, 100, og 300 mg PCB180 per kg seg tydelig fra rottene eksponert for 0 og 1000 mg PCB per kg. Derfor vil det være mest rimelig å sammenligne resultatene fra rottene eksponert for 3, 100 og 300 mg PCB180 per kg for seg selv.

#### 4.3.1 Aminosyrekonsentrasjoner

Målinger av aminosyrekonsentrasjoner på halve hjerner fra voksne SD-rotter eksponert for 1000 mg PCB180 per kg viste en signifikant oppgang i glysin-konsentrasjonen på 15% i forhold til kontrollene. Det ble derimot ikke målt forskjeller i aspartat konsentrasjonen i hjernehalvdeler fra rottene som var eksponert for 1000 mg PCB180 per kg. Rottene som ble eksponert for 3 og 300 mg PCB180 per kg ble sammenlignet mot hverandre og viste ingen signifikante forskjeller. Målinger av aminosyrekonsentrasjon i striatum fra 5 uker gamle WKY- og SHR-rotter eksponert for 9 mg PCB153 per kg sammenlignet med WKY- og SHR-kontroller

viste ingen signifikante forskjeller. Dette skyldes trolig at disse rottene ble eksponert for mye lavere konsentrasjoner PCB (9 mg/kg mot 1000 mg/kg). Det er også mulig at PCB kan ha virkning på aminosyrer i andre hjernedeler enn striatum. Rottene eksponert for 1000 mg PCB180 per kg var mye eldre under eksponeringen (voksne) mens rottene eksponert for 9 mg PCB153 per kg var barn da de ble eksponert (8-22 dager gamle) og ungdommer da de ble avlivet. Alderen for eksponering er viktig. Under utvikling skjer det prosesser som er svært viktig for hvordan den modne hjernen fungerer og derfor vil eksponering i ung alder forventes å gi flest effekter. Overføring av lave konsentrasjoner PCB via placenta til foster har vist å kunne gi langvarige nevrokjemiske skader (Faroon et al. 2001). Selv om PCB180 og PCB153 er ulike kongenerer og kan ha ulik virkning, er det allikevel stor sannsynlighet disse to kongenerene har mye av de samme virkningsmekanismene siden begge er *di-ortho*-substituerte kongenerer og ligner på hverandre i konformasjonen.

Siden PCB-eksponering kan gi ADHD-lignende symptomer som nedsatt læringsevne og hyperaktivitet var det interessant å sammenligne resultatene fra ADHD-rottemodellen SHR og fra PCB-eksponerte rotter. I helhjerne-homogenat fra ueksponerte 8 uker gamle SHR og WKY-rotter ble det observert en signifikant oppgang i glysin-konsentrasjonen på 10% hos SHR i forhold til WKY (se avsnitt 4.2.1). En oppgang i glysin konsentrasjonen på 15% ble også målt på hjernehalvdeler fra voksne SD-rotter eksponert for 1000 mg PCB180 per kg. Dette kan tyde på en sammenheng mellom glysin konsentrasjon og observert atferd hos SHR og rotter eksponert for 1000 mg PCB180 per kg. SHR-rottene viste også en signifikant nedgang på 24% i aspartat konsentrasjonen i forhold til WKY, men rottene eksponert for 1000 mg PCB180 per kg viste ingen forskjell i Aspartat konsentrasjoner. Glysin er en aminosyre som er viktig for NMDA-reseptor aktivering.

### 4.3.2 Effekten av PCB180 på $\alpha_4/\beta_2$ nikotinreseptor-subenhet binding

Måling av høy- og lav-affinitetsbinding til  $\alpha_4/\beta_2$  nikotinreseptor-subenheter med [ $^3\text{H}$ ]epibatidin på halve hjerner fra voksne SD-rotter eksponert for 1000 og 100 mg PCB180 per kg viste ingen signifikant forskjell fra sine kontroller. Måling på hippocampus fra 5 uker gamle WKY- og SHR-rotter eksponert for 9 mg PCB153 per kg og kontroller med lav-affinitetskonsentrasjoner av nM [ $^3\text{H}$ ]epibatidin, viste heller ingen signifikante forskjeller fra kontroll.

Nikotinreseptorer er viktig for motorisk kontroll, læring, optimal hukommelse og atferd (Felix og Levin 1997; Marks et al. 2006; Taylor og Brown 2006). ADHD-rottemodeller (SHR) viser nedsatt nikotinreseptor-binding i hjernen i forhold til WKY, og dette kan tenkes å medvirkende for SHR-rottenes ADHD-lignende atferd. Siden det var ønskelig å undersøke om PCB kan være en medvirkende årsak i utviklingen av ADHD var det interessant å sammenligne reseptorbinding mellom SHR og PCB-eksponerte rotter. Ved sammenligning av  $\alpha_4/\beta_2$ -subenhetene hos 5 uker gamle WKY- og SHR-rotter ble det funnet henholdsvis 15-17% og 38% lavere binding i totalhjerne og hippocampus fra SHR i forhold til WKY (se avsnitt 4.2.2). Resultatene viste ingen sammenheng mellom PCB180 eksponerte voksne SD-rotter og unge SHR. Tidlig eksponering av rotte barn regnes for å kunne gi større konsekvenser siden hjernen fortsatt er under utvikling. Eksponering av unge rotter med 9 mg PCB153 per kilo er en ganske lav eksponerings dose. Rottene som ble eksponert for de høyeste dosene av PCB180 (1000 og 100 mg/kg) var voksne da de ble eksponert og hjernen var trolig ferdig utviklet. Når hjernen er ferdigutviklet er den også mer robust siden blod-hjerne-barriæren er etablert. Det kan derfor være interessant å undersøke om PCB153/180-eksponering av høye doser slik som 1000 mg/kg hos nyfødte rottebarn kan ha effekt på nikotinreseptorer.

### 4.3.3 Effekt av PCB på dopaminreseptor D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> binding

Effekten av PCB180 på dopaminreseptor-subenhetene D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> ble undersøkt med [<sup>3</sup>H]SCH23390 på hjernehalvdeler fra voksne SD-rotter eksponert for 1000 mg PCB180 per kg og kontroller. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller på D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-binding mellom kontroll og PCB-eksponerte rotter.

Måling av dopaminreseptorene D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> og D<sub>2</sub> ble også utført av Roth-Harer et al. (2001) på homogenat fra hjernedeler som prefrontal cortex, nucleus accumbens, striatum anterior og striatum posterior. Målingene ble gjort med binding av [<sup>3</sup>H]SCH23390 og [<sup>3</sup>H]spiperone, og viste ingen forskjeller i dopaminreseptorkonsentrasjon eller affinitet mellom rotter eksponert for PCB77 (ikke *ortho*-substituert tetraklorbifenyyl) og kontroller. Rottene som ble brukt i denne studien var av typen Wistar og ble prenatalt eksponert for 1 mg PCB77 per kg. Alderen til disse rottene ved avlivning var fra 1 år til 3 måneder som tilsvarer godt voksne. Rottene som ble brukt i denne oppgaven var også voksne ved avlivning men ble derimot også eksponert for PCB180 i voksen alder. Det var også forskjellig type PCB-kongenerer som ble brukt, i denne oppgaven ble rottene eksponert for PCB180 som var *di-ortho*-substituert mens Roth-Harer og medarbeidere eksponerte rottene med ikke-*ortho*-substituert PCB77. Konsentrasjonen av PCB-eksponering var i tillegg mye høyere hos våre SD-rotter (1000 mot 1 mg/kg). Våre målinger ble gjort på hjernehalvdeler, mens deres målinger ble gjort i ulike hjernedeler. Til tross for ulike prosedyrer stemmer resultatene overens med hverandre ved at det ikke ble observert noen endringer i D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-subenhetbinding hos PCB-eksponerte rotter i forhold til kontroll.

### 4.3.4 Effekt av PCB153 på NMDA-reseptor binding med [<sup>3</sup>H]Mk801

NMDA-reseptorer er viktige for læring og hukommelse, men kan også være involvert i eksitotoksisitet (Myhrer 1993; Hollmann og Heinemann 1994). NMDA-avhengig LTP i sentralnervesystemet regnes for å være en viktig mekanisme for læring og hukommelse og hippocampus er et spesielt viktig område for dette (Racine et al. 1983; Fonnum et al. 1995). Siden ADHD-rottemodeller (SHR) viser nedsatt



---

læringsevne i forhold til normale rotter (WKY). Nedsatt læringsevne er også observert hos rotter eksponert for PCB. Av den grunn var det ønskelig å undersøke om læringsvanskene hos SHR og PCB-eksponerte rotter skyldes endrede NMDA-reseptorer.

Effekten av PCB153 på NMDA-reseptorbinding ble målt med [ $^3\text{H}$ ]Mk801 i homogenat fra hippocampus hos 5 uker gamle WKY- og SHR-rotter eksponert for 9 mg PCB153 per kg og kontroller. Resultatene viste ingen signifikante forskjeller, men en tendens for høyere NMDA-reseptorbinding hos WKY- og SHR-rotter eksponert for PCB i forhold til deres kontroller. Det var heller ingen forskjell på NMDA-binding mellom WKY-kontroller og SHR-kontroller. Selv om det ikke ble funnet noen signifikante forskjeller i hippocampus kan det likevel være forskjeller i NMDA-reseptornivå i andre hjernedeler. Det er også mulig at høyere doser av PCB ville gitt større effekt siden 9 mg PCB153 per kg er en ganske lav dose.

Forsøk gjort av Altmann et al. (2001) støtter våre funn ved at de heller ikke fant noen signifikante forskjeller i NMDA-reseptorbinding i hippocampus mellom PCB-eksponerte rotter og deres kontroller. Derimot fant de signifikant lavere NMDA-reseptorbinding og LTP ved målinger i hjernebarken av PCB-eksponerte rotter i forhold til kontroll. I dette forsøket ble det brukt 25-31 uker gamle Long-Evans-rotter (kontroller som WKY). Disse rottene ble eksponert for PCB-miksturen Aroclor 1254 og RM (en rekonstruert mikstur av PCB-kongenerer som tenkes å finnes i brystmelk). Eksponeringen foregikk ved å gi hann og hunn rotter 4 mg PCB-mikstur per kg i 50 dager, før disse ble paret. Eksponeringen fortsatte under parringen fram til rottebarna ble født. Rottebarna ble eksponert prenatalt og også etter fødselen på grunn av overføring av PCB via morsmelken. Studien støtter våre funn av at det ikke ble funnet noen effekt av PCB på NMDA-reseptorer i hippocampus. Funn gjort av Altmann et al. (2001) gir grunnlag for å tro at PCB kan ha en innvirkning på LTP og NMDA-reseptornivå i enkelte hjernedeler, som hjernebarken, men ikke i hippocampus.

I denne oppgaven ble NMDA-reseptorbinding ikke funnet å være forskjellig hos SHR- og WKY-rotter i hippocampus (se avsnitt 4.2.3), dette støtter resultatene som ikke viser noen sammenhenge med PCB153 eksponering og endret NMDA-reseptorbinding. Som diskutert i avsnitt 4.2.3 fant Jensen et al (Jensen et al. 2009) dysfunksjonelle NMDA-reseptorer i hippocampus fra SHR ved hjelp av elektrofysiologiske målinger. Jensen og medarbeidere fant også resultater som tyder på at NMDA-avhengig LTP i SHR-rottene i større grad er avhengig av NMDA-reseptor subenhetene NR2B sammenlignet med WKY. Resultatene til Jensen et al. (Jensen et al. 2009) antyder at NMDA-reseptor-funksjon kan være endret uten at det er forskjeller i NMDA-reseptorbinding.

## 4.4 Oppsummering

Det er blitt foreslått at PCB-eksponering kan være en medvirkende faktor for utvikling av ADHD. Det var derfor ønskelig å undersøke ulike biokjemiske parametre i hjerner fra rottemodeller av ADHD (SHR) og rotter eksponert for PCB og sammenligne disse mot hverandre og med kontroller. Analysene som ble gjort omfattet målinger av aminosyrekonsentrasjon, nikotinreseptor-, NMDA-reseptor-, og dopaminreseptor-målinger. Dette ble gjort for å undersøke hvordan hjernen til ADHD-rottemodellene skiller seg biokjemisk fra kontrollene, og for å undersøke om PCB-eksponerte rotter viser samme biokjemi som ADHD-rottene.

I denne oppgaven ble det funnet 24% lavere konsentrasjon av aminosyren aspartat og 10% høyere konsentrasjon av glysin i hele hjerner fra unge SHR i forhold til WKY. Dette var interessant siden både aspartat og glysin kan binde seg til NMDA-reseptoren og sammen føre til aktivering. I tillegg er NMDA-reseptoren viktig for optimal hukommelse og læring. I striatum fra SHR og WKY ble det ikke funnet noen forskjeller i aminosyrekonsentrasjonen. Det ble i tillegg vist at voksne SD-rotter eksponert for høye konsentrasjoner PCB180 (1000 mg/kg) hadde tilsvarende økning i glysin konsentrasjon på 15% sammenlignet med kontroller, ved måling i

hjernehalvdeler. Dette kan tyde på en sammenheng mellom glysin konsentrasjon observert hos PCB-eksponerte rotter og SHR-rotter, som er en dyremodell for ADHD. Derimot viste de PCB-eksponerte SD-rottene ingen nedgang i aspartat-konsentrasjon. Eksponering av lavere konsentrasjoner PCB180 og PCB 153 (300, 100, 9 og 3 mg/kg) viste ingen endringer i aminosyrekonsentrasjonene.

$\alpha_4/\beta_2$ -Nikotinreseptor-subenhetbinding i hjernehalvdeler viste at SHR hadde ca 15% høyere nivå av  $\alpha_4/\beta_2$ -subenhetene i venstre hjernehalvdel sammenlignet med høyre. WKY og ADD hadde omtrent likt nivå  $\alpha_4/\beta_2$ -subenheter i venstre og høyre hjernehalvdel.  $\alpha_4/\beta_2$ -Nikotinreseptor-nivået var lavere hos SHR i forhold til WKY og ADD ved måling på hele hjerner (ca 15%) og hippocampus (38%). Hippocampus er en av flere hjernedel som har mange nikotinerge nevroner og stimulering av disse nevronene er viktig for å opprettholde optimal hukommelse, læring og atferd (se avsnitt 1.1.4). Færre nikotinreseptorer vil derfor forbindes med nedsatt læring og hyperaktivitet, som er karakteristiske trekk hos SHR-rotter. ADD-rottene viste læreversker og konsentrasjonssvikt men ikke hyperaktivitet. At det kun var nedsatt binding av  $\alpha_4/\beta_2$ -subenhetene hos SHR-rotter kan tyde på at denne effekten er relatert til hyperaktivitet. Eksponeringer for høye PCB180 doser (1000 mg PCB per kg) hos voksne SD-rotter viste ingen effekt på  $\alpha_4/\beta_2$ -subenhet-binding på hjernehalvdeler. Det var heller ingen effekt av lave konsentrasjoner PCB153 (9 mg PCB per kg) på binding av disse reseptorsubenhetene i hippocampus fra unge SHR og WKY.

Eksponering for høye konsentrasjoner PCB (1000 mg PCB per kg) i halvhjerner fra voksne SD-rotter forårsaket ingen endringer i nivå av  $D_1/D_5$ -dopaminreseptorer. Det ble ikke målt dopaminreseptorbinding i hjernehomogenat fra SHR- og WKY-rotter.

NMDA-reseptorbinding ble målt i hippocampus fra SHR- og WKY-rotter eksponert for PCB153, og fra kontroller. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom noen av gruppene. Selv om våre og andres bindingsstudier ikke viser endringer på NMDA-reseptornivåer i hippocampus etter PCB-eksponering, har andre studier vist at det kan være redusert binding i andre hjernedeler. Det har også blitt vist at det kan være funksjonelle feil ved disse reseptorene i hippocampus (se avsnitt 4.3.4).

NMDA-reseptoren er viktig for kognitive funksjoner som hukommelse og læring. Studier av ulykker og arbeidseksposeringer har vist at eksponering for PCB, kan gi kognitive forstyrrelser. PCB-eksponering har også vist å føre til glutamaterg celledød *in vitro*, noe som muligens kan gi utslag ved måling av NMDA-reseptorer. På grunnlag av dette kan det være en mulig sammenheng mellom lærevansker og PCB-eksponering.

## 4.5 Forslag til videre arbeid

I denne oppgaven var det ønskelig å undersøke om eksponering for PCB kan være en medvirkende årsak til utvikling av ADHD. For å undersøke dette ble det sett på biokjemiske parametre i hjernen til rottemodeller for ADHD (SHR og ADD) sammenlignet med kontroller. I tillegg ble rottemodellene for ADHD sammenlignet med PCB-eksponerte SHR-, WKY- og kontroll-dyr. De nevrokjemiske undersøkelsene som ble gjort var relatert til ulike typer reseptor-binding og aminosyrekonsentrasjoner i hjernen. Det ble funnet interessante forskjeller i konsentrasjonen av aminosyren glysin både hos rottemodeller for ADHD og PCB-eksponerte kontrollrotter. I tillegg ble det funnet lavere konsentrasjon av aspartat hos ADHD rotter sammenlignet med kontroller. Det ble også funnet lavere nAChR-binding i hjerner hos ADHD-modellen sammenlignet med kontroll. Ved videre forsøk ville det vært interessant å undersøke følgende i hjerner av PCB-eksponerte SHR og WKY-rotter:

- Måle konsentrasjon av acetylkolin i ulike hjernedeler
- Molekylære studier av nikotin- og NMDA-reseptorer
- Måle NMDA-reseptornivå i flere hjernedeler

Studier av dopamintransportør-proteinnivå i plasmamembran og vesikkelmembran i rottemodellen for ADHD og kontrolldyr pågår for tiden i vårt laboratorium.

## Kildeliste

- Al-Awadi, M., A. Pavlik og H. Al-Sarraf (2006). "Increased brain uptake and brain to blood efflux transport of  $^{14}\text{C}$ -GABA in spontaneously hypertensive rats." Life Sciences **79**(9): 847-853.
- Altmann, L., W. Mundy, T. Ward, A. Fastabend og H. Lilienthal (2001). "Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: effects on long-term potentiation and  $[^3\text{H}]$ MK-801 binding in occipital cortex and hippocampus." Toxicological Sciences **61**(2): 321-330.
- Amenta, F., M. Di Tullio og D. Tomassoni (2003). "Arterial hypertension and brain damage--evidence from animal models (review)." Clinical and Experimental Hypertension **25**(6): 359-380.
- Arnsten, A. (2006). "Fundamentals of attention-deficit/hyperactivity disorder: circuits and pathways." Journal of Clinical Psychiatry **67**(Suppl 8): 7-12.
- Banerjee, T. D., F. Middleton og S. V. Faraone (2007). "Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder." Acta Paediatrica **96**(9): 1269-1274.
- Barkley, R. (2002). "International consensus statement on ADHD. January 2002." Clinical Child and Family Psychology **5**(2): 89-111.
- Bartolo, P. D., L. Mandolesi, F. Federico, F. Foti, D. Cutuli, F. Gelfo og L. Petrosini (2009). "Cerebellar involvement in cognitive flexibility." Article in press.
- Bechtel, N., M. Kobel, I. Penner, M. Klarhofer, K. Scheffler, K. Opwis og P. Weber (2009). "Decreased fractional anisotropy in the middle cerebellar peduncle in children with epilepsy and/or attention deficit/hyperactivity disorder: A preliminary study." Article in press.
- Biederman, J. og S. Faraone (2005). "Attention-deficit hyperactivity disorder." The Lancet **366**(9481): 237-248.
- Bjerregaard, P. (2005). Økotoxikologi, Gyldendal

- 
- Bush, B., J. Snow og R. Koblitz (1984). "Polychlorobiphenyl (PCB) congeners, p,p'-DDE, and hexachlorobenzene in maternal and fetal cord blood from mothers in Upstate New York." Arch Environ Contam Toxicol **13**(5): 517-27.
- Bylund, D. og M. Toews (1993). "Radioligand binding methods: practical guide and tips." American Journal of Physiology **265**(5 Pt 1): 421-429.
- Chevrier, J., B. Eskenazi, N. Holland, A. Bradman og D. Barr (2008). "Effects of exposure to polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides on thyroid function during pregnancy." American Journal of Epidemiology **168**(3): 298-310.
- Choi, D. W. (1988). "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system." Neuron **1**(8): 623-634.
- DasBanerjee, T., F. Middleton, D. Berger, J. Lombardo, T. Sagvolden og S. Faraone (2008). "A comparison of molecular alterations in environmental and genetic rat models of ADHD: a pilot study." American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics) **147B**(8): 1554-1563.
- Denison, M. og S. Nagy (2003). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **43**: 309-334.
- Durham, S. og A. Brouwer (1989). "3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl-induced effects in the rat liver. I. Serum and hepatic retinoid reduction and morphologic changes." Toxicologic Pathology **17**(3): 536-544.
- Faroon, O., D. Jones og C. de Rosa (2001). "Effects of polychlorinated biphenyls on the nervous system." Toxicology and Industrial Health **16**(7-8): 305-333.
- Felix, R. og D. Levin (1997). "Nicotinic antagonist administration into the ventral hippocampus and spatial working memory in rats." Neuroscience **81**(4): 1009-1077.
- Ferrari, R., A. Frasoldati, G. Leo, C. Torri, I. Zini, L. Agnati og M. Zoli (1999). "Changes in nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs and nicotinic binding in spontaneously hypertensive stroke prone rats." Neuroscience Letters **277**(3): 169-172.

- 
- Fisk, A., C. d. Wit, M. Wayland, Z. Kuzyk, N. Burgess, R. Letcher, B. Braune, Norstrom, R. B. SP, C. Sandau, E. Lie, H. Larsen, J. Skaare og D. Muir (2005). "An assessment of the toxicological significance of anthropogenic contaminants in Canadian arctic wildlife." Science of the Total Environment **351-352**: 57-93.
- Flick, D., R. O'Dell og V. Childs (1965). "Studies of the chick edema disease. 3. Similarity of symptoms produced by feeding chlorinated biphenyl." Poultry Science **44**(6): 1460-1465.
- Fonnum, F. (1984). "Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain." Journal of Neurochemistry **42**(1): 1-11.
- Fonnum, F. og E. A. Lock (2004). "The contributions of excitotoxicity, glutathione depletion and DNA repair in chemically induced injury to neurones: exemplified with toxic effects on cerebellar granule cells." Journal of Neurochemistry **88**: 513-531.
- Fonnum, F., E. Mariussen og T. Reistad (2006). "Molecular mechanisms involved in the toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and brominated flame retardants (BFRs)." Journal of Toxicology and Environmental Health **69**(1-2): 21-35.
- Fonnum, F., T. Myhrer, R. E. Paulsen, K. Wangen og A. R. Oksengard (1995). "Role of glutamate and glutamate receptors in memory function and Alzheimer's disease." Annals of the New York Academy of Sciences **757**: 475-486.
- Frith, C. og R. Dolan (1996). "The role of the prefrontal cortex in higher cognitive functions." Cognitive Brain Research **5**(1-2): 175-181.
- Gattu, M., J. Pauly, K. Boss, J. Summers og J. Buccafusco (1997). "Cognitive impairment in spontaneously hypertensive rats: role of central nicotinic receptors. I." Brain Research. **771**(1): 89-103.
- Gorman, A. M., S. Ceccatelli og S. Orrenius (2000). "Role of mitochondria in neuronal apoptosis." Developmental Neuroscience **22**(5-6): 348-358.

- 
- Gotti, C., L. Riganti, S. Vailati og F. Clementi (2006). "Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery." Current Pharmaceutical Design **12**(4): 407-428.
- Greengard, P. (2001). "The neurobiology of slow synaptic transmission." Science. **294**(5544): 1024-1030.
- Hassel, B., H. Bachelard, P. Jones, F. Fonnum og U. Sonnewald (1997). "Trafficking of amino acids between neurons and glia in vivo. Effects of inhibition of glial metabolism by fluoroacetate." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **17**(11): 1230-1238.
- Hassel, B. og R. Dingledine (2006). Glutamate. Basic Neurochemistry: Molecular, and Mediacal Aspects 7th edn. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady og D. L. Price, Elsevier Academic Press.
- Heyser, C., M. Wilson og L. Gold (1995). "Coloboma hyperactive mutant exhibits delayed neurobehavioral developmental milestones." Developmental Brain Research **89**(2): 264-269.
- Holene, E., I. Nafstad, J. Skaare og T. Sagvolden (1998). "Behavioural hyperactivity in rats following postnatal exposure to sub-toxic doses of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126." Behavioural Brain Research **94**(1): 213-224.
- Hollmann, M. og S. Heinemann (1994). "Cloned glutamate receptors." Annual Review of Neuroscience **17**: 31-108.
- Holz, R. W. og S. K. Fisher (2006). Synaptic Transmission and Cellular Signaling: An Overview. Basic Neurochemistry: Molecular, and Mediacal Aspects 7th edn. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady og D. L. Price, Elsevier Academic Press.
- Houghtling, R., M. Davila-Garcia og K. Kellar (1995). "Characterization of (+/-)(-)[3H]epibatidine binding to nicotinic cholinergic receptors in rat and human brain." Molecular Pharmacology **48**(2): 280-287.
- Jensen, S. (1966). "Report of a new chemical hazard." New Scientist **32**: 612



- 
- Jensen, V., J. Rinholm, T. Johansen, T. Medin, J. Storm-Mathisen, T. Sagvolden, O. Hvalby og L. Bergersen (2009). "N-methyl-D-aspartate receptor subunit dysfunction at hippocampal glutamatergic synapses in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder." Neuroscience **158**(1): 353-364.
- Johannessen, C. U., D. Petersen, F. Fonnum og B. Hassel (2001). "The acute effect of valproate on cerebral energy metabolism in mice." Epilepsy Research **47**(3): 247-256.
- Johansen, E., T. Sagvolden og G. Kvande (2005). "Effects of delayed reinforcers on the behavior of an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD)." Behavioural Brain Research **162**(1): 47-61.
- Kent, L., F. Middle, Z. Hawi, M. Fitzgerald, M. Gill, C. Feehan og N. Craddock (2001). "Nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder." Psychiatric Genetics **11**(1): 37-40.
- Kew, J. og J. Kemp (2005). "Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology." Psychopharmacology (Berl) **179**(1): 4-29.
- Koeman, J., M. ten Noever de Brauw og R. de Vos (1969). "Chlorinated biphenyls in fish, mussels and birds from the River Rhine and the Netherlands coastal area." Nature **221**(5186): 1126-1128.
- Koller, G., M. Moder og K. Czihal (2000). "Peroxidative degradation of selected PCB: a mechanistic study." Chemosphere **41**(12): 1827-1834.
- Kuhar, M. J., K. Minneman og E. C. Muly (2006). Catecholamines. Basic Neurochemistry: Molecular, and Mediacal Aspects 7th edn. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady og D. L. Price, Elsevier Academic Press.
- La Rocca, C. og A. Mantovani (2006). "From environment to food: the case of PCB." Ann Ist Super Sanita journal **42**(4): 410-416.
- Lee, M., C. Breese, M. Strook og S. Leonard (2001). "The effect of nicotine and haloperidol co-treatment on nicotinic receptor levels in the rat brain." Molecular Brain Research **86**(1-2): 115-124.

- 
- Letcher, R., J. Lemmen, B. v. d. Burg, A. Brouwer, A. Bergman, J. Giesy og M. v. d. Berg (2002). "In vitro antiestrogenic effects of aryl methyl sulfone metabolites of polychlorinated biphenyls and 2,2-bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethene on 17beta-estradiol-induced gene expression in several bioassay systems." Toxicological Sciences **69**(2): 362-372.
- Livingstone, P., J. Srinivasan, J. Kew, L. Dawson, C. Gotti, M. Moretti, M. Shoaib og S. Wonnacott (2009). "alpha7 and non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors modulate dopamine release in vitro and in vivo in the rat prefrontal cortex." European Journal of Neuroscience **29**(3): 539-550.
- Maervoet, J., A. Covaci, P. Schepens, C. Sandau og R. Letcher (2004). "A reassessment of the nomenclature of polychlorinated biphenyl (PCB) metabolites." Environmental Health Perspectives **112**(3): 291-294.
- Mannuzza, S. og R. Klein (2008). "Lifetime criminality among boys with attention deficit hyperactivity disorder: a prospective follow-up study into adulthood using official arrest records." Psychiatry Research **160**(3): 237-246.
- Mariussen, E., P. Andersson, M. Tysklind og F. Fonnum (2001). "Effect of polychlorinated biphenyls on the uptake of dopamine into rat brain synaptic vesicles: a structure-activity study." Toxicology and Applied Pharmacology **175**(2): 176-183.
- Mariussen, E. og F. Fonnum (2001). "The effect of polychlorinated biphenyls on the high affinity uptake of the neurotransmitters, dopamine, serotonin, glutamate and GABA, into rat brain synaptosomes." Toxicology. **159**(1-2): 11-21.
- Mariussen, E. og F. Fonnum (2006). "Neurochemical targets and behavioral effects of organohalogen compounds: an update." Critical Reviews in Toxicology **36**(3): 253-289.
- Mariussen, E., O. Myhre, T. Reistad og F. Fonnum (2002). "The polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1254 induces death of rat cerebellar granule cells: the involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor and reactive oxygen species." Toxicology and Applied Pharmacology **179**(3): 137-144.

- 
- Marks, M., P. Whiteaker og C. Collins (2006). "Deletion of the alpha7, beta2 or beta4 nicotinic receptor subunit genes identifies highly expressed subtypes with relatively low affinity for [3H]Epibatidine." Molecular Pharmacology **70**: 947-959.
- Marsden, C. (2006). "Dopamine: the rewarding years." British Journal of Pharmacology **147**(1): 136-144.
- Masson, J., C. Sagne, M. Hamon og S. E. Mestikawy (1999). "Neurotransmitter transporters in the central nervous system." Pharmacological Reviews **51**(3): 439-464.
- Matykiewiczova, N., J. Klanova og P. Klan (2007). "Photochemical degradation of PCBs in snow." Environmental Science & Technology **41**(24): 8308-8314.
- Mengerink, Y., D. Kutlan, F. Toth, A. Csampai og I. Molnar-Perl (2002). "Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry study." Journal of Chromatography A **949**(1-2): 99-124.
- Miller, G., R. Gainetdinov, A. Levey og M. Caron (1999). "Dopamine transporters and neuronal injury." Trends in Pharmacological Sciences **20**(10): 424-429.
- Missale, C., S. Nash, S. Robinson, M. Jaber og M. Caron (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." Physiol Rev. **78**(1): 189-225.
- Mitoma, Y., N. Egashira og C. Simion (2009). "Highly effective degradation of polychlorinated biphenyls in soil mediated by a Ca/Rh bicatalytic system." Chemosphere. **74**(7): 968-973.
- Miyaji, T., N. Echigo, M. Hiasa, S. Senoh, H. Omote og Y. Moriyama (2008). "Identification of a vesicular aspartate transporter." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(33): 11720-11724.
- Myhrer, T. (1993). "Animal models of Alzheimer's disease: glutamatergic denervation as an alternative approach to cholinergic denervation." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **17**(2): 195-202.

- 
- Nabha, L., J. Garbern, C. Buller og J. Charpie (2005). "Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats." Clinical and Experimental Hypertension **27**(1): 71-82.
- Nakanishi, S. og M. Masu (1994). "Molecular diversity and functions of glutamate receptors." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **23**: 319-348.
- Nebert, D. (1989). "The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects." Critical Reviews in Toxicology **20**(3): 153-174.
- Nissim, I. (1999). "Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes." American Journal of Physiology **277**(4 Pt 2): 493-497.
- Noma, Y., Y. Mitsuhashi, K. Matsuyama og S. Sakai (2007). "Pathways and products of the degradation of PCBs by the sodium dispersion method." Chemosphere. **68**(5): 871-879.
- Norenberg, M. D., Z. Huo, J. T. Neary og A. Roig-Cantesano (1997). "The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission." Glia **21**(1): 124-133.
- Parker, M., S. Harvey, W. Luetje og (2001). "Determinants of agonist binding affinity on neuronal nicotinic receptor beta subunits." Pharmacology **299**(1): 385-391.
- Racine, R. J., N. W. Milgram og S. Hafner (1983). "Long-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain." Brain Research **260**(2): 217-231.
- Raine, C. S. (2006). Neurocellular Anatomy. Basic Neurochemistry: Molecular, and Mediacal Aspects 7th edn. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady og D. L. Price, Elsevier Academic Press.
- Rang, H., M. Dale, J. Ritter og P. Moore (2003). Pharmacology 5th edn, Churchill Livingstone.
- Rehfeld, B., R. J. Bradley og M. Sunde (1971). "Toxicity studies on polychlorinated biphenyls in the chick. 1. Toxicity and symptoms." Poultry Science **50**(4): 1090-1096.

- 
- Risebrough, R., P. Rieche, D. Peakall, S. Herman og M. Kirven (1968).  
"Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem." Nature. **220**(5172):  
1098-1102.
- Rostad, O. (2009). "Nevrokjemiske undersøkelser av to dyremodeller for ADHD-  
Måling av reseptorbinding og monoaminnivåer i hjernen"  
Mastergradsoppgave ved Universitetet i Oslo-Avdeling for farmasøytisk  
biovitenskap-Farmasøytisk institutt.
- Roth-Harer, A., H. Lilienthal, M. Bubser, U. Kronthaler, W. R Mundy, T. R Ward,  
W. Schmidt, H. Winterhoff og G. Winneke (2001). "Neurotransmitter  
concentrations and binding at dopamine receptors in rats after maternal  
exposure to 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl: the role of reduced thyroid hormone  
concentrations." Environmental Toxicology and Pharmacology **9**(3): 103-115.
- Safe, S. (1984). "Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls  
(PBBs): biochemistry, toxicology, and mechanism of action." Critical Reviews  
in Toxicology **13**(4): 319-391.
- Safe, S. (1990). "Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs),  
dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and  
mechanistic considerations which support the development of toxic  
equivalency factors (TEFs)." Crit Rev Toxicol **21**(1): 51-88.
- Sagvolden, T., T. Dasbanerjee, Y. Zhang-James, F. Middleton og S. Faraone (2008).  
"Behavioral and genetic evidence for a novel animal model of Attention-  
Deficit/Hyperactivity Disorder Predominantly Inattentive Subtype."  
Behavioral and Brain Functions **4**: 56.
- Sagvolden, T., V. Russell, H. Aase, E. Johansen og M. Farshbaf (2005). "Rodent  
models of attention-deficit/hyperactivity disorder." Biological Psychiatry  
**57**(11): 1239-1247.
- Sagvolden, T. og J. A. Sergeant (1998). "Attention deficit/hyperactivity disorder--  
from brain dysfunctions to behaviour." Behavioural Brain Research **94**(1): 1-  
10.

- 
- Sasaki, S., T. Kuwabara, T. Yoshitomi, Y. Yoneda, K. Takenaka, T. Takesako, M. Tanaka, M. Hirata, S. Tanabe og T. Nakata (1992). "Decreased hypothalamic and medullary GABA turnover in spontaneously hypertensive rats." Cardiovascular Research **26**(3): 261-264.
- Schantz, S., B. Seo, P. Wong og I. Pessah (1997). "Long-term effects of developmental exposure to 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95) on locomotor activity, spatial learning and memory and brain ryanodine binding." Neurotoxicology **18**(2): 457-467.
- Schantz, S., J. Widholm og D. Rice (2003). "Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children." Environ Health Perspect. **111**(3): 357-576.
- Schousboe, A., G. Svenneby og L. Hertz (1977). "Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres." Journal of Neurochemistry **29**(6): 999-1005.
- Seegal, R. (1996). "Epidemiological and laboratory evidence of PCB-induced neurotoxicity." Critical Reviews in Toxicology **26**(6): 709-737.
- Snyder, G., A. Fienberg, R. Huganir og P. Greengard (1998). "A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor." Journal of Neuroscience **18**(24): 10297-10303.
- Solanto, M. (2002). "Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research." Behavioural Brain Research **130**(1-2): 65-71.
- Sonnevald, U., N. Westergaard og A. Schousboe (1997). "Glutamate transport and metabolism in astrocytes." Glia **21**(1): 56-63.
- Stach, J., V. Pekarek, R. Grabic, M. Lojkasek og V. Pacakova (2000). "Dechlorination of polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans on fly ash." Chemosphere. **41**(12): 1881-1887.
- Takagaki, g., s. Berl, d. Clarke, d. Purpura og h. Waelsch (1961). "Glutamic acid metabolism in brain and liver during infusion with ammonia labelled with nitrogen-15." Nature. **189**: 326.

- 
- Taylor, P. og J. H. Brown (2006). Acetylcholine. Basic Neurochemistry: Molecular, and Mediacal Aspects 7th edn. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady og D. L. Price, Elsevier Academic Press.
- Terry, A. J., C. Hernandez, J. Buccafusco og M. Gattu (2000). "Deficits in spatial learning and nicotinic-acetylcholine receptors in older, spontaneously hypertensive rats." Neuroscience **101**(2): 357-368.
- Todd, R., E. Lobos og L. Sun (2003). "Mutational analysis of the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene in attention deficit/hyperactivity disorder: evidence for association of an intronic polymorphism with attention problems." Molecular Psychiatry **8**(1): 103-108.
- Voie, O. og F. Fonnum (2000). "Effect of polychlorinated biphenyls on production of reactive oxygen species (ROS) in rat synaptosomes." Archives of Toxicology **73**(10-11): 588-593.
- Voie, O., A. Johnsen og H. Rossland (2002). "Why biota still accumulate high levels of PCB after removal of PCB contaminated sediments in a Norwegian fjord." Chemosphere. **46**(9-10): 1367-1372.
- Voie, O. A., M. Tysklind, P. L. Andersson og F. Fonnum (2000). "Activation of respiratory burst in human granulocytes by polychlorinated biphenyls: A structure-activity study." Toxicology and Applied Pharmacology **167**(2): 118-124.
- Volkow, N., G. Wang, J. Fowler, S. Gatley, J. Logan, Y. Ding, R. Hitzemann og N. Pappas (1998). "Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate." American Journal of Psychiatry. **155**(10): 1325-1331.
- Vos, J. og J. Koeman (1970). "Comparative toxicologic study with polychlorinated biphenyls in chickens with special reference to porphyria, edema formation, liver necrosis, and tissue residues." Toxicology and Applied Pharmacology **17**(3): 656-668.
- Waagepetersen, H. S., H. Qu, U. Sonnewald, K. Shimamoto og A. Schousboe (2005). "Role of glutamine and neuronal glutamate uptake in glutamate homeostasis

---

and synthesis during vesicular release in cultured glutamatergic neurons."

Neurochemistry International **47**(1-2): 92-102.

Williams, J. og L. Ross (2007). "Consequences of prenatal toxin exposure for mental health in children and adolescents: a systematic review." European Child & Adolescent Psychiatry **16**(4): 243-253.

Yamada, S., Y. Kagawa, H. Ushijima, N. Takayanagi, T. Tomita og E. Hayashi (1987). "Brain nicotine cholinceptor binding in spontaneous hypertension." Brain Research **410**(2): 212-218.

Yao, S. og A. Lawrence (2005). "A comparative autoradiographic study of the density of [3H]SR95531, [3H]MK-801 and [3H]cGMP binding in the locus coeruleus and central pontine grey of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **371**(5): 434-439.